

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Componentes insulino-inmunorreactivos del plasma

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Esperanza Lázaro Martínez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD DE MADRID
Facultad de Medicina

"COMPONENTES INSULINO- INMUNORREACTIVOS DEL PLASMA"

Examen de:

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. TAMARIT TORRES

Vocal: Sr. Dr. DIAZ RUBIO

Vocal: Sr. Dr. Fdez. CRUZ

Vocal: Sr. Dr. GIL SANZ GARCIA

Vocal Secretario: Sr. Dr. ORIO L. BOICH

Tesis presentada para optar al grado de

DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA

por la licenciada

M. Esperanza Lázaro Martínez

Madrid, Febrero 1972



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5315115284

El trabajo experimental que presento como Tesis para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugia, ha sido realizado en el Departamento de Metabolismo del Instituto G. Marañón (C.S.I.C.) bajo la dirección del Profesor, Doctor José Luis Rodríguez Candela, a quien deseo expresar mi más sincero agradecimiento por la ayuda e interes que en todo momento me ha dispensado.

Igualmente quiero agradecer la ayuda recibida de los Drs. José Gomez Acebo y Roberto Parrilla, con quienes me inicié en los conocimientos del tema.

Al Dr. Emilio Herrera por su interes y consejos en la confección del manuscrito.

Al Dr. D. E. Chance de Eli Lilly Research Laboratories (Indianapolis U.S.A.) por su obsequio generoso de la insulina, proinsulina y péptido C utilizados en este estudio.

A D. Amador del Campo por su valiosa asistencia técnica, y a Dña. Amparo Ocaña.

Este trabajo ha sido realizado con una beca del Ministerio de Educación y Ciencia, dentro del plan de formación de personal investigador, a quien deseo expresar mi agradecimiento.

I N D I C E

Páginas

INTRODUCCION:

A.- Insulina en la sangre	2
B.- Métodos para determinar la insulina en la sangre (plasma ó suero)	3
I.- Métodos de valoración biológica	4
a). Métodos de valoración "in vivo"	5
b). Métodos de valoración "in vitro"	5
II.- Métodos de valoración inmunológica	8
a). Método de RBD-Hemaglutinación-Inhibición	9
b). Método de la hormona marcada con I^{125} ó con I^{131} (Radioinmunoensayo)	10
C.- Comparación de los resultados obtenidos por los Métodos biológicos e inmunológicos	12
I.- Antagonistas de la insulina	13
II.- Diferentes formas de "actividad insulínica del plasma" (ILA)	15

	<u>Páginas</u>
III.- Insulina inmunorreactiva	22
ESQUEMA DE LA TESIS:	
A.- Planteamiento teórico del problema investigado	30
I.- Secreción de insulina producida por carbohidra- tos	33
II.- Secreción de insulina producida por proteínas y aminoácidos	35
III.- Factores humorales en el control de la secreción de insulina: Hormonas intestinales	36
a). Secretina	37
b). Cholecistokinina-Pancreocimina	43
B.- Objetivos	48
C.- Situaciones investigadas.....	51
MATERIALES Y METODOS:	
A.- Animales de experimentación	53
B.- Preparación de los animales	53
C.- Productos utilizados como estímulos insulinogénicos ...	55
D.- Otros productos utilizados	57
E.- Valoración de las glucemias	58
F.- Fraccionamiento proteico de los plasmas	61
G.- Valoración inmunológica de la insulina	66
G-1). Marcaje de la insulina con I ¹²⁵	66

	<u>Páginas</u>
G-2). Purificación de la insulina-I ¹²⁵	69
G-3). Determinación del porcentaje de hormona marca- da intacta y del grado de pureza de las fraccio- nes	72
G-4). Cálculos	77
G-5). Radioinmunoensayo	79
H.- Aislamiento de "big insulina", "little insulina" y "mini insulina"	93
 RESULTADOS:	
I.- Componentes insulino-inmunorreactivos en el plasma de conejos en ayuno de 24 horas	97
II.- Componentes insulino-inmunorreactivos en el plasma como respuesta al ayuno prolongado (48 horas)	104
III.- Componentes insulino-inmunorreactivos en el plas- ma como respuesta a la administración de glucagón ..	109
IV.- Componentes insulino-inmunorreactivos en el plasma como respuesta a la administración de tolbutamida ..	114
V.- Componentes insulino-inmunorreactivos en el plas- ma como respuesta a la administración de secretina ..	118
Experimento complementario del grupo V	128
VI.- Componentes insulino-inmunorreactivos en el plasma como respuesta a la administración de pancreocimina ..	132

VII.- Componentes insulino-inmunorreactivos en el plasma como respuesta a la administración de glucosa intravenosa	141
VIII.- Componentes insulino-inmunorreactivos en el plasma como respuesta a la administración de glucosa oral	146
Aislamiento de los componentes "big insulina", "li- ttle insulina" y "mini insulina"	153
Caracterización cromatográfica.....	155
Caracterización inmunológica	162
DISCUSION	167
RESUMEN Y CONCLUSIONES	208
CONCLUSION GENERAL	216
BIBLIOGRAFIA	218

INTRODUCCION

A.- INSULINA EN LA SANGRE.

El aislamiento por Banting y Best (1), en 1921, de la insulina procedente del páncreas, y su cristalización por Abel en 1926(2), continua por algún tiempo con estudios dirigidos a conocer y caracterizar la naturaleza y estructura química de la hormona. Esto no se consigue hasta muchos años después, cuando Sanger y col (3), como resultado de sus brillantes trabajos, logran conocer la secuencia de aminoácidos y caracterizar la estructura primaria de la insulina de bovino y, posteriormente de la insulina de otras especies animales y la humana (4,5).

La prueba más concluyente de la presencia de la hormona en la sangre circulante sería, pues, la extracción e identificación química de la estructura primaria de la molécula de insulina en el material extraído. No obstante, hasta la fecha carecemos de esta evidencia directa, por lo que cuando empleamos el término de insulina endógena ó plasmática, tenemos que aceptar que nos referimos a una sustancia en sangre ó plasma, que tiene varias de las propiedades físicas, químicas, biológicas e inmunológicas de la insulina pancreática.

El aislamiento y purificación de la insulina en sangre ha presentado siempre problemas de gran complejidad, debido, en primer lugar,

a que la hormona circula a concentraciones muy bajas, que generalmente no exceden del orden de 10^{-8} M. Por otra parte, debemos anotar el gran número de sustancias, de las que hay que separar la hormona durante el procedimiento de su purificación. De lo que se deduce la imposibilidad de obtener, a partir del plasma ó suero, suficiente material para poder estudiar las características químicas de la insulina en sangre.

B.- METODOS PARA DETERMINAR LA INSULINA EN SANGRE (PLASMA O SUERO)

Las diferentes técnicas desarrolladas para valorar el contenido de insulina en sangre, se basan en dos principios generalmente aceptados: la actividad biológica de la hormona y su capacidad antigénica. De aquí que los métodos se puedan dividir en:

I) Técnicas biológicas, que comprenden: a) Valoraciones "in vivo", basadas en el hecho de que el plasma ó suero inyectado a animales de experimentación produce un efecto insulínico; este efecto se determina y compara con el efecto producido por soluciones standard de insulina (soluciones con concentraciones conocidas de insulina). b) Valoraciones "in vitro", en las que un tejido aislado se incuba en suero ó plasma, y el efecto producido en el tejido por el suero (valorando uno de los parámetros metabólicos de la hormona), se compara con el efecto producido por soluciones standard de insulina.

II) Técnicas inmunológicas, en las que la insulina del plasma se determina por su reacción con antisueros específicos anti-insulina.

En todas estas técnicas, lo que se utiliza para medir el contenido de insulina en sangre es, el efecto metabólico ó inmunológico de la hormona. No obstante, el efecto metabólico valorado por las técnicas biológicas, no depende solamente del contenido de insulina en el plasma; ni es cierto que toda la insulina determinada inmunológicamente corresponda a insulina biológicamente activa. De aquí que, la actividad valorada por las técnicas biológicas se denomine " actividad insulínica del plasma" (ILA), y la actividad que se determina por las técnicas inmunológicas sea llamada " insulina inmunorreactiva" (IRI).

I). Métodos de valoración biológica.-

Hasta aproximadamente 1955 las valoraciones de insulina en la sangre se hicieron exclusivamente por métodos biológicos, basados en medir los efectos metabólicos de la hormona, sobre animales de experimentación ó en tejidos aislados de estos animales.

Sin embargo, es muy difícil determinar la especificidad de estos métodos, ya que no se conoce una reacción biológica específica para la molécula de insulina; por lo que, cuando valoramos la actividad biológica en suero ó plasma, no podemos excluir la posibilidad

de valorar al mismo tiempo otros factores diferentes de la insulina. El empleo de otros criterios, como por ejemplo, ver si la actividad biológica es mayor en la vena pancreática que en sangre periférica, si aumenta despues de un estímulo fisiológico de la secreción de in sulina como es la glucosa oral ó intravenosa, ó si la actividad desaparece con el empleo de procederes que destruyen la insulina ó despues de una pancreatectomía, etc..., son factores que ayudan en la interpretación de los datos obtenidos.

a) Los métodos de valoración "in vivo"; son poco sensibles y requieren mucho tiempo en la preparación de los animales; el proceder expe rimental en sí, es tecnicamente difícil y está asociado a gran mortalidad, por lo que hay muy pocos estudios publicados con esta meto dología (6, 7).

Sin embargo, las técnicas "in vivo" poseen un interes especial cuando se aplican a la valoración de la actividad insulínica de un plasma ó suero, empleando como "test" a un animal de la misma especie a que pertenece dicho plasma. En este caso, la valoración se hace en las mismas condiciones fisiológicas en que actua la insulina.

b) Los métodos de valoración "in vitro" son los más generalizados; - utilizan como tejidos metabólicos, principalmente, el músculo diafragma aislado de rata ó ratón, y el tejido adiposo de epidídimo de rata.

Como índices de la actividad insulínica del plasma, en el músculo

diafragma se valora esencialmente la captación de glucosa (8-9-10-11) la síntesis de glucógeno (12) y la síntesis de proteínas a partir de aminoácidos- C^{14} (13).

La sensibilidad de estas técnicas es variable, dependiendo del parámetro y de las modificaciones introducidas. En cuanto a su especificidad, un gran número de estudios sugieren que las valoraciones obtenidas por el método del diafragma de rata son bastante específicas y se deben a un efecto de la insulina en plasma. La mayor parte de estos estudios emplean modificaciones del método que valora la captación de glucosa. Con esta técnica se ha demostrado que la actividad insulínica del plasma desaparece después del tratamiento del plasma con cisteína y glutatión (9 - 11). También se ha demostrado que, cuando se añaden antisueros específicos anti-insulina al plasma, no hay estimulación en la captación de glucosa ni incorporación de glicina- C^{14} a proteínas por dicho tejido (14 - 15).

Por otra parte, Mezt y col. (16) observan mayor actividad insulínica en la sangre de la vena pancreática-duodenal, que en la sangre de la arteria femoral, y la pancreatectomía a perros y gatos hace desaparecer la actividad insulínica del plasma en dicho tejido (17).

Todo esto parece indicar que, cuando se valora la actividad insulínica del plasma por el método del diafragma de rata, los resultados obtenidos se deben a la insulina circulante. No obstante, queda

por aclarar si la actividad insulínica valorada por esta técnica in
dica unicamente la cantidad de hormona biologicamente activa del plasma
ó si este contiene otros factores (posiblemente de caracter hor-
monal) que influyen en la determinación de la actividad insulínica,
inhibiendo ó estimulando la actividad debida propiamente a la insu-
lina (16 - 17 - 18).

El tejido adiposo de epidídimo de rata se utiliza por primera
vez para estudios metabólicos hacia 1954 (19), por la gran sensibili-
dad que tiene para la utilización de la glucosa.

Basados en los distintos efectos metabólicos de la insulina, se
han desarrollado una serie de técnicas para valorar la actividad in
sulínica del plasma en este tejido.

La mayor parte de los trabajos publicados miden los siguientes
parámetros: captación de glucosa (20 - 21), oxidación de glucosa-1-C^{I4}
a ^{I4}CO₂, producción de ^{I4}CO₂ ó "cambio neto de gas" (22 - 23) y la
incorporación de glucosa-1-C^{I4} a lípidos-C^{I4} (24).

El método que valora la oxidación de la glucosa-1-C^{I4} a ^{I4}CO₂ -
se debe a Renold y col. (25) y es uno de los más utilizados en casi
todos los laboratorios.

Se ha discutido mucho sobre la especificidad, es decir si el -
método de valoración en tejido adiposo de epidídimo de rata valora,
ademas de la insulina, otras sustancias que tienen su mismo efecto

sobre el metabolismo de la glucosa. Esto es debido a los siguientes hechos:

I.- La actividad insulínica del plasma valorada en tejido adiposo, no desaparece despues de la pancreatectomia, mientras que la determinada por las técnicas inmunológicas ó por el método del diafragma de rata, desaparece (26,27)

2.- La actividad insulínica valorada en el tejido adiposo, solo se inhibe parcialmente por los antisueros específicos anti-insulina, en contraste con la actividad insulínica valorada por el diafragma de rata, que se inhibe totalmente (22,26,28).

3.- Otras hormonas y aminoácidos (leucina) presentes en el plasma, tienen los mismos efectos que la insulina, sobre el metabolismo de la glucosa en tejido adiposo (29,30,31).

II.- Métodos de valoración inmunológica.-

A partir aproximadamente de 1958, el interes de los científicos se dirige al desarrollo de una técnica que, junto a una gran sensibilidad, fuese específica, para aplicarla a la valoración de la insulina en sangre. Esto se consigue con los métodos inmunológicos, basados en la capacidad antigénica de la hormona, puesta en duda por algún tiempo (32), pero aceptada más tarde, cuando Lowell (33) y Lerman (34) demuestran que el suero de humanos resistentes a la insulina,

podía neutralizar en los ratones el efecto hipoglucémico producido por la insulina. Posteriormente, Moloney y Coval (35) demuestran en cobayas inmunizados la aparición de anticuerpos neutralizantes de la insulina; y Berson, empleando insulina- I^{131} , demuestra la presencia de anticuerpos anti-insulina en todos los enfermos tratados con la hormona (36 - 37).

La base de todos los métodos inmunológicos es, una reacción antígeno-anticuerpo, en la que la hormona a valorar actúa como antígeno.

El primer requisito necesario para una valoración inmunológica, es un sistema para poder detectar y medir la reacción antígeno-anticuerpo, a muy bajas concentraciones de antígeno.

El gran número de métodos ideados se basan en dos principios - diferentes:

a) Método de RBD-Hemaglutinación-Inhibición, que utiliza la aglutinación de eritrocitos sensibilizados como una manifestación de la - reacción antígeno-anticuerpo.

Arquilla y Stavitsky (38) fueron los primeros en el empleo de este método para la determinación de la insulina, utilizando anticuerpos de conejos inmunizados.

Este método no es suficientemente sensible para aplicarlo a la valoración de insulina en sangre, por lo que no se usa en la actualidad.

b) Método de la hormona marcada con Iodo¹³¹ ó con Iodo¹²⁵ (Inmunoensayo).

Las observaciones de Yalow y Berson (37) de que el suero de personas tratadas con insulina de bovino ó porcino contiene anticuerpos que se unen a la insulina, y que, concentraciones crecientes de insulina de bovino, producen una disminución progresiva en la unión de la insulina-I¹³¹ con los anticuerpos, fueron la base para el desarrollo de una nueva técnica de valoración de la insulina en sangre (39,40,41,42).

Uno de los grandes avances del radioinmunoensayo es, el alto grado de sensibilidad que puede obtenerse, lo cual es esencial para poder valorar los niveles fisiológicos a los que se encuentra la insulina en la sangre. No obstante, la sensibilidad y precisión de estas técnicas depende, de la actividad específica de la insulina radioactiva empleada y de la capacidad de reacción del antígeno con el anticuerpo.

Desde que Yalow y Berson idearon el método que lleva su nombre, hasta la actualidad, se han desarrollado un grán número de técnicas, de tal manera que puede decirse que es raro el laboratorio de prestigio que no posee su propia modificación técnica. Todas las diferentes técnicas se basan en el mismo principio, sus diferencias están en los distintos procedimientos empleados para la separación de la insulina radioactiva libre, del complejo formado por la insulina radioactiva unida al anticuerpo.

MATERIALES Y CONDICIONES EMPLEADOS EN ALGUNOS INMUNOENSAYOS
DE INSULINA EN PLASMA O SUERO

Fecha	Autores	Tampon	Incubación	Técnicas de separación	Límite inferior de sensibilidad
1960	Yalow-Berson	Veronal 0.1 M pH 8,6	4 días 4°C	Cromatoelectroforesis	0.1 μ U/ml.
1960	Grodsky Forsham	Glicina 0.2 M pH 8,5 30% urea	1 hora 25°C	Precipitado del complejo con sulfato sódico	20 μ U/ml.
1963	Hales-Randle	Fosfato 0.04 M pH 7,4	6 horas con el Standard 16 horas con la - Insulina	Precipitado del complejo con 2° - anticuerpo	6 μ U/ml.
1963	Morgan Lazarow	Borato 0.13 M pH 8,5	6 a 25 h. 4°C	"	2 μ U/ml.
1965	Herbert y col.	Veronal pH 7,4	2 horas 37°C	Charcooldextrano	0-5 μ U/ml.

La especificidad de estas técnicas inmunológicas viene determinada por las observaciones siguientes:

- I.- En los perros pancreatectomizados no se puede valorar la insulina en sangre por las técnicas inmunológicas (27).
- 2.- La insulina determinada inmunologicamente desaparece despues del

tratamiento del suero ó plasma con cisteína. Por otra parte, si se añade al suero insulina, la insulina valorada por estas técnicas se eleva en una cantidad correspondiente a la hormona añadida (43).

3.- En personas normales, la ingestión de glucosa produce una elevación en la concentración de insulina inmunorreactiva en el plasma (44 - 45).

Es de considerable interes que, Yalow y Berson demuestran que un derivado de la insulina (desoctapeptido insulina) que no tiene actividad biológica se puede valorar por estas técnicas, mientras que las cadenas A y B de la insulina no reaccionan con los anticuerpos anti-insulina (46).

Grodsky y col. (47) estudian los productos de conversión de la insulina, y encuentran que, tanto la insulina tratada con carboxipeptidasa ó dinitro-benzol sulfato, ó la insulina que ha sufrido una esterificación suave, pueden reaccionar con los antisueros específicos anti-insulina.

5.- COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LOS METODOS BIOLOGICOS E INMUNOLOGICOS.

En la determinación del contenido de Insulina en sangre por las técnicas biológicas, hay que tener en cuenta que, junto a la insulina en sí, el plasma o suero contiene una serie de factores que pue-

den actuar, y de hecho actúan, sobre los mismos parámetros metabólicos que la hormona, unas veces inhibiendo y otras potenciando su acción; de tal manera que, los valores obtenidos por estas técnicas son el resultado de la acción de la propia insulina y sustancias con acción insulínica (insulina biologicamente activa), y de posibles antagonistas.

I.- Antagonistas de la insulina.-

Un hecho que complica la exactitud de las técnicas biológicas "in vitro" es, la falta de proporcionalidad que se observa en las concentraciones de la "actividad insulínica"(ILA) obtenidas en el suero total ó en el suero diluido, siendo mucho mayores los valores conseguidos en el segundo caso.

El efecto de la dilución se demostró primeramente en las determinaciones hechas con el método del diafragma de rata (48,49), y posteriormente Ball y Merrill (23) también observan este efecto al emplear el tejido adiposo de epidídimo de rata. Los estudios de Yalow y Berson (45), y de Hales y Randle (50) empleando los métodos inmunológicos, no encuentran este efecto, y las concentraciones de insulina inmunorreactiva decrecen proporcionalmente con la dilución.

El hecho de que el efecto de dilución se pueda demostrar por el método del diafragma de rata, parece indicar que se debe a la presen-

cía de uno o varios antagonistas de la insulina, cuyos efectos desaparecerían con la dilución. Esta suposición gana apoyo experimental cuando Groen y col. (51) demuestran que el efecto antagonista de la epinefrina en concentraciones fisiológicas desaparece con la dilución.

De igual manera, se puede considerar que el efecto de la dilución que se observa en el método del tejido adiposo de epididimo de rata, se debe a la presencia de un antagonista de la insulina que desaparece con la dilución. Aunque en el suero normal no se conocen antagonistas que tengan efecto sobre este tejido; por lo que parece más probable que el efecto de dilución, en este caso, depende de la existencia de un factor que actúa activando la insulina biológicamente inactiva. En favor de esto último está la observación de que el tejido adiposo contiene un factor capaz de activar la "insulina combinada" (I. bound) (52).

Estudios publicados durante los últimos años han demostrado la existencia de antagonistas de la insulina, no solamente en el suero de personas normales y de pacientes diabéticos, sino también en el suero de animales de experimentación diabéticos (rata y gato).

Hasta ahora se han descrito en el hombre hasta cinco antagonistas, aunque no se sabe con certeza si pueden ser la misma o diferentes sustancias, ya que sólo en casos muy excepcionales los investigadores han intentado comparar sus resultados.

Vallance-Owen ha publicado numerosos estudios sobre los antagonistas de la insulina. El describe en el suero de las personas normales y diabéticas, la existencia de un antagonista de la insulina, cuyos efectos desaparecen con la dilución del suero (53). Es de considerable interés hacer notar que este antagonista solamente tiene efecto en las técnicas que emplean el diafragma de rata, mientras que carece de acción sobre el tejido adiposo de epidídimo (54).

En trabajos de este mismo investigador, usando las técnicas de fraccionamiento del suero por TCA ó etanol, encuentra el efecto antagonista localizado en la fracción de la albúmina.

La naturaleza del antagonista de Vallance-Owen no está clara, pues si bien, por una parte parece depender de la presencia de las glándulas adrenales ó de la hipófisis (55,56), con lo cual su naturaleza sería de origen hormonal, por otra parte, parece tener una serie de características fisico-químicas en común con la cadena B de la insulina; en este último caso sería un producto derivado de la ruptura de la molécula de insulina, formado quizá durante el procedimiento de extracción (57).

II.- Diferentes formas de "actividad insulínica del plasma" (IIA).

Con el desarrollo de las técnicas radioinmunológicas, se pone de manifiesto la diferencia que existe entre la insulina en sangre valorada por estas técnicas, y la actividad insulínica del plasma valorada por

las técnicas biológicas. En el primer caso los valores encontrados son de tres a cinco veces más bajos.

Esta discrepancia se hace comprensible, cuando se comprueba que menos del 10 % de la actividad insulínica total se neutraliza por los anticuerpos específicos anti-insulina (58,59), lo que se puede interpretar, al menos, de dos maneras:

1º.- La actividad insulínica del plasma (IIA) no se debe solo a la insulina, sino que junto a esta se valoran una serie de sustancias con efecto insulínico.

2º.- Una fracción de la insulina del plasma no reacciona con los antisueros específicos anti-insulina, y por tanto no se puede valorar por las técnicas radioinmunológicas, ni neutralizar por los antisueros específicos. En este caso, la fracción de insulina plasmática que no puede reaccionar con los anticuerpos, tampoco estimula la captación de glucosa por el diafragma de rata "in vitro"; sería pues, una forma inactiva de la insulina .

El conocimiento de la presencia en el plasma de sustancias con efecto insulínico, ha hecho en los últimos años, que un gran número de investigadores centrasen todo su interés en revisar nuevamente e interpretar los datos obtenidos por las diferentes técnicas biológicas, empleando para ello diversos procedimientos, con el fin de separar la parte de "IIA" que se debe a la propia insulina, de la que se

debe a otras sustancias con actividad insulínica.

Aunque estas sustancias con actividad insulínica han recibido diferentes nombres (IIA no supresible, insulina combinada ó insulina atípica), posiblemente correspondan al mismo material, aunque al ser diferentes los procedimientos empleados en su estudio, son muy difíciles de valorar los resultados obtenidos.

a). "Actividad insulínica supresible (SILA) , y nó supresible (NSILA)".

Varios investigadores (28,60), por medio del método del tejido adiposo de epidídimo de rata han demostrado que, en el plasma normal, solamente una parte de la "IIA" se puede neutralizar con anticuerpos específicos anti-insulina, que suprimen totalmente la actividad biológica de la insulina pancreática. La actividad insulínica del plasma que no se inhibe por los anticuerpos ha sido denominada "actividad no supresible" (NSILA), y la que se neutraliza es reconocida como "actividad insulínica supresible" (SILA).

Las características físicas de la "NSILA" han sido extensamente estudiadas por Froechs y col. Encuentran que electroforéticamente la "NSILA" se localiza en la zona correspondiente a las globulinas α_2 y β (61), y la cromatografía en sephadex G-200 indica un peso molecular de 70.000 y 150.000.

Por otra parte, el grupo mencionado ha conseguido aislar del plasma una sustancia con las mismas características biológicas que

la "NSILA". Los estudios de este material purificado han demostrado, que el peso molecular de esta sustancia depende del pH de la solución en que está diluida. Si el pH es ácido, el peso molecular es de 7.000; y a pH alcalino corresponde un peso molecular de 100.000 a 200.000 (61). Estos investigadores sugieren que la sustancia a pH alcalino forma polímeros, y que estos se disocian a pH ácido.

Para ver si la "NSILA" tiene la misma estructura que la insulina pancreática, tratan el producto con ácido fórmico, que separa las cadenas A y B de la insulina. Con este procedimiento no han sido capaces de demostrar la presencia de la cadena A en el material que corresponde a la actividad no supresible (62).

Las características biológicas de la "NSILA" son iguales que las de la insulina pancreática, tanto en las técnicas "in vivo" como en las "in vitro". La inactivación con cisteína ó glutatión, ha demostrado una inhibición parcial de su actividad. El tratamiento con urea y glutatión inhibe completamente su actividad.

Los estudios que se han realizado para aclarar el sitio del organismo donde se produce la "NSILA", sugieren que se forma en el hígado (63,64), y que representa un producto de transformación de la insulina (63), aunque los resultados obtenidos empleando la perfusión del hígado no lo han podido confirmar (65).

En cuanto a la actividad supresible "SILA", los valores obtenidos

en todos los estudios realizados, se corresponden perfectamente con los valores encontrados por las técnicas inmunológicas (21,59,66), por lo que es muy probable que ambas técnicas valoren la misma forma de insulina en el plasma.

b) "Insulina combinada e insulina libre".-

Antoniades y col. (67,68,69), sugieren que la insulina que circula en la sangre se encuentra en dos formas distintas denominadas, "insulina libre" (free I.) e "insulina combinada" (bound I.).

La "insulina libre" es similar a la insulina cristalizada, es secretada por el páncreas cuando se estimula con glucosa, es biológicamente activa, y reacciona con los anticuerpos específicos anti-insulina. Posee un peso molecular aproximadamente de 12.000 (pH 8.0) y una movilidad electroforética similar a la albúmina y globulinas α .

La "insulina combinada", puede representar una forma de insulina combinada ó ligada a una proteína básica del plasma. Tiene la propiedad de ser absorbida por una resina de cambio de iones (Dowex-50w x 8), y de la que se extrae usando un medio ácido ó alcalino; en el primer caso es inactiva sobre diafragma de rata, aunque conserva su actividad sobre tejido adiposo (52,70).

Antoniades sugiere que la "insulina combinada" se produce "in vivo" en el hígado y, posiblemente, en otros tejidos extrapancreáticos (71), Las preparaciones purificadas parcialmente tienen un pe-

so molecular de 40.000 a 60.000 y una movilidad electroforética similar a las globulinas β y α . No reacciona con los anticuerpos específicos, y su actividad biológica no se inhibe cuando se incuba durante una ó dos horas con tejido adiposo de rata en presencia de anticuerpos. Cuando se incuba durante un tiempo mayor, se produce una inhibición parcial (72,73). Por último, se ha visto que la actividad biológica es muy similar a la de la insulina pancreática (71,73).

c). "Actividad insulínica"(IIA) en los extractos ácido-alcohol.-

Varios laboratorios han estudiado las características de la actividad insulínica (IIA) en el plasma tratado con ácido-etanol (74, 75). Las técnicas empleadas han sido, ó bien el método original utilizado durante mucho tiempo para la extracción de la insulina del páncreas, ó bien una serie de modificaciones todas ellas basadas en dicho método. Estos estudios no permiten llegar a ninguna conclusión, ya que los resultados son muy contradictorios, probablemente debido a las diferentes modificaciones introducidas en los métodos.

Las propiedades físicas de la "IIA" en los extractos TCA-etanol parece que corresponden a un peso molecular de 300.000, y también que los extractos contienen albúmina inmunológicamente activa (76).

d). "Separación de la actividad insulínica (IIA) por electroforesis".-

Como en el apartado anterior, se han utilizado diferentes procedimientos electroforéticos para la separación de la "IIA".

Algunos investigadores dializan a temperatura ambiente las fracciones obtenidas por electroforesis; este procedimiento aumenta la "ILA" en las fracciones (77). Mientras que otros omiten este paso. Es to da lugar a que los resultados obtenidos no sean en todo comparables.

En los estudios realizados con técnicas similares, la "ILA" del suero se distribuye en dos fracciones. Una de ellas, "Fracción A", que comprende la mayor parte de la "ILA," corresponde a la zona de la albúmina y globulinas α ; la otra fracción, "Fracción B", corresponde a las globulinas $\beta - \alpha$ (78 - 79 - 80). Aunque una sola inves tigación parece indicar que la ILA de la "fracción B" es inactiva sobre diafragma "in vitro" (80), la mayor parte de las investigacio nes demuestran que ambas fracciones son activas sobre diafragma y - tejido adiposo de rata (78 - 79 - 81 - 82).

La adición de anticuerpos específicos suprimen la ILA en ambas fracciones, pero los resultados son diferentes pues algunos investi gadores encuentran una supresión completa (79 - 80), y otros sólo - una inhibición parcial (77).

En cuanto a la importancia biológica de la "ILA" de las fracciones A y B, no se conoce bien (80 - 83), aunque se puede suponer que la "ILA" de la fracción A (que parece depender de la concentración de glu cosa en el suero), puede tener importancia en la regulación de la -

glucemia (64,80).

Los estudios realizados en perros, valorando la actividad insulínica (ILA) de las fracciones A y B en diferentes sitios de la circulación (64), han demostrado que la "ILA" de ambas fracciones es mayor en la vena pancreática que en sangre periférica y que, después de la pancreatectomía tiende a disminuir (84). Estos experimentos sugieren que la "ILA" de las dos fracciones es producida probablemente en el páncreas.

III.- Insulina inmunológicamente activa (IRI).-

La insulina plasmática capaz de reaccionar con los anticuerpos específicos anti-insulina y, por tanto, valorada por las técnicas inmunológicas, se denomina insulina inmunorreactiva (IRI) (45); y sus valores se corresponden bien con los valores determinados para la actividad insulínica supresible (SILA) por la técnica del tejido adiposo de rata (85,44,63,83), por lo que es muy probable que ambas representen la misma forma de insulina.

Las propiedades físicas de esta insulina han sido aclaradas en los últimos años, por estudios realizados principalmente por Yalow y Berson, mediante la caracterización primero, de la insulina exógena procedente del páncreas y añadida al suero, y una comparación posterior con la insulina endógena. Así se ha llegado a las siguientes con-

Conclusiones:

- 1ª) La insulina en plasma reacciona con los anticuerpos específicos de manera similar a la insulina pancreática (45).
- 2ª) La insulina plasmática se absorbe a la celulosa y se destruye con la cisteína de una manera semejante a la insulina cristalina o Insulina I¹³¹ (45).
- 3ª) Por ultracentrifugación del plasma, la mayor parte de la insulina endógena se recupera en el sobrenadante, en una zona limítrofe a la albúmina, de igual manera que lo hace la Insulina I¹³¹ añadida al plasma (86).
- 4ª) Por electroforesis del plasma, la insulina endógena se recupera en la misma región que la insulina cristalina (86).
- 5ª) La cromatografía del plasma en sephadex 6-75 indica un peso molecular de la insulina inmunológicamente activa, similar al peso molecular de la Insulina I¹³¹, y mucho más bajo que el de la albúmina - (87).

Todo ello sugiere que la insulina inmunológicamente activa probablemente circula en plasma de forma libre, no ligada a ninguna proteína plasmática de alto peso molecular; y por otra parte, que esta insulina posee las mismas características físicas que la insulina pancreática añadida al plasma.

Los estudios realizados, valorando la concentración de insulina

inmunologicamente activa en diferentes situaciones fisiológicas y experimentales, parecen indicar que esta forma de insulina plasmática se produce en el páncreas, y desarrolla un papel muy importante en la regulación de las concentraciones de glucosa en la sangre (88,89 27).

Ahora bien, aunque se ha observado que la inyección de potentes antisueros específicos anti-insulina, a ratas (90) y ratones (35) producen diabetes agudas, y en conejos y gatos marcadas hiperglucemias (91), por lo que se admite como probable que toda la insulina hormonalmente activa es capaz de reaccionar con los anticuerpos anti-insulina, cabe formarse la pregunta siguiente: ¿Valoran las técnicas radioinmunológicas solamente insulina biologicamente activa, ó pueden valorar en el plasma otros componentes insulínicos que, si bien reaccionan con los antisueros específicos anti-insulina, carecen de actividad biológica?.

Los trabajos realizados desde los tres ó cuatro últimos años ponen de manifiesto, una vez más, el problema tan complejo que representa el estudio y valoración de la insulina circulante.

Hasta aproximadamente unos cinco años atrás, parecía como probable que, la insulina se sintetizaba en las células β , como resultado de la combinación de las dos cadenas A y B, sintetizadas a su vez por separado (92,93).

Steiner y col. en 1967 publican un trabajo original, donde

demuestran que la insulina se sintetiza en forma de una única cadena polipeptídica, a la que denominan "proinsulina", por considerarla un precursor en la biosíntesis de la hormona.

La existencia de "proinsulina" fué demostrada por primera vez en adenomas de islotes de Langerhans humanos (94,95). Trabajos posteriores "in vitro" con islotes pancreáticos normales de rata y de ratón (96,97) de páncreas fetal de ternera (98) e islotes de peces, confirman la existencia de este precursor en las secuencias biosintéticas de la formación de la insulina.

Los resultados realizados con preparaciones de insulina cristalizada de origen pancreático, han demostrado también la existencia de "proinsulina" en una proporción de 2 a 3 %, lo que indica que esta molécula es un componente normal de todas las preparaciones de insulina cristalizada (99,100,101).

La "proinsulina" es una cadena única, polipeptídica, de un peso molecular aproximadamente de 9.000, que se inicia con la secuencia de aminoácidos de la cadena B y termina con la secuencia de aminoácidos de la cadena A, ambas cadenas están conectadas entre sí por un segmento peptídico de 30 residuos de aminoácidos (péptido C) (94,99,100,101). Esta estructura, en forma de una cadena sencilla de aminoácidos, facilita la correcta formación de los enlaces disulfuro de la molécula de insulina, que posteriormente es liberada de la "proinsulina" antes de

su secreción desde las células β (93,96,100).

Una vez establecida la importancia de la "proinsulina" en la biosíntesis de la insulina, se penso, que existia la posibilidad que las células β pudieran secretarla en ciertas condiciones fisiológicas ó patológicas y de esta manera, dicha molécula podria circular en la sangre como tal estructura. Rubenstein y col. (102), fueron los primeros investigadores que lograron demostrar la existencia de la "proinsulina" en la sangre y orina de personas normales y de enfermos diabéticos. Posteriormente, estudios "in vitro" han demostrado que despues de una incubación de 200 minutos, los islotes aislados de la rata segregan al medio de incubación una pequeña cantidad de "proinsulina", que aunque se podria interpretar como un artefacto del sistema experimental, parece más probable sea debido a la existencia de una secreción activa de este precursor en las condiciones "in vitro" (96,99).

El hecho de que la "proinsulina" reacciona con los antisueros específicos, se observó yá en el primer estudio de Steiner; no obstante, la valoración de la "proinsulina" por los métodos radioinminológicos corrientes ha resultado ser muy difícil, por haberse demostrado que el péptido C contiene los mayores determinantes antigénicos de la molécula, y que este péptido C varia mucho en las distintas especies animales (103), lo que hace muy necesario la existencia de antisueros específicos para cada especie. En uno de los últimos trabajos publica-

dos por Melani y col (104), se ha desarrollado un sistema específico para la valoración del péptido C.

De otro lado, se ha demostrado que la actividad biológica de la "proinsulina" es mucho menor que la actividad de la propia insulina. Cuando se valora por el método que utiliza las células grasas aisladas, presenta una actividad biológica del orden del 2 % de la actividad de la insulina (105), y menos del 5 % en el músculo sartorio de la rana (106) . La "proinsulina" de porcino posee una actividad insulínica de 3 U/ mg, valorada por la técnica de las convulsiones en el raton (107).

Independientemente de los estudios realizados por Steiner y su grupo, Roth y col. publican en 1968 un trabajo que desde mi punto de vista personal, si nó es tan espectacular como el realizado por Steiner, sí tiene un indudable gran valor ya que llega a los mismos resultados, empleando para ello unos medios y conocimientos que están al alcance de cualquier laboratorio de investigación: una técnica radioinmunológica y un método de fraccionamiento proteico en geles de sephadex.

Roth y col.(108) encuentran que, al filtrar el plasma de personas por una columna de sephadex G-50, la insulina endógena se separa en dos componentes, ambos con reacción inmunológica frente a los anticuerpos específicos anti-insulina. Uno de estos componentes eluye en una zona que corresponde a un peso molecular de 6.000 (la misma

posición que la insulina cristalizada de origen pancreático); el otro componente, de un peso molecular de aproximadamente 9.000 eluye en una posición anterior a la insulina. Ambos componentes se denominan "little insulina" y "big insulina", respectivamente. Roth en este trabajo original, ya plantea la posibilidad de una analogía entre el componente "big insulina" y la "proinsulina".

Por su parte, Rubenstein y col.(102) hacen similares conjeturas; pero es más tarde Lazarus y col. (109) quienes, con experimentos análogos y resultados semejantes, confirman este hecho. Hoy es admitido, que el componente "big insulina" corresponde al "pico b" que Steiner observó en la insulina cristalizada de origen pancreático, y por tanto dicho componente comprende no solo a la "proinsulina", sino también a las llamadas "formas intermedias".

La relación entre la "proinsulina" y la "insulina anormal" descrita por Elliot y col.(110,111) en enfermos diabéticos, es difícil de aclarar ya que se han utilizado diferentes procedimientos técnicos en sus estudios; sin embargo, ambas formas tienen en común, su reacción inmunológica con los antisueros específicos anti-insulina y su baja actividad biológica.

ESQUEMA DE LA TESIS

A.- PLANTEAMIENTO TEORICO DEL PROBLEMA INVESTIGADO EN LA PRESEN-
TE TESIS.

Como hemos podido observar en la introducción de esta Tesis Doctoral, la valoración de la insulina en la sangre ha presentado siempre serios problemas. El desarrollo de las técnicas inmunológicas, basadas en una reacción específica antígeno-anticuerpo, representó un avance considerable en el estudio de los mecanismos fisiopatoló-
gicos de la secreción de insulina.

En los últimos diez años ha aparecido un considerable número - de trabajos, en los que se han estudiado las concentraciones de insulina en plasma como respuesta a numerosos estímulos, tanto en personas normales y diabéticas, como en animales de experimentación.

No obstante, los trabajos publicados en 1967 por Steiner y su grupo, así como en 1968 por Roth y colaboradores, han abierto un - nuevo horizonte en los conocimientos que se tenían, indicando que - la fisiología de la secreción de insulina necesita ser de nuevo revisada completamente, con respecto de la especificidad y significación de los valores de insulina inmunorreactiva publicados previamente.

Ante estos hechos, es obvia la necesidad de un nuevo planteamiento en el estudio del mecanismo de secreción de la insulina, a causa

de la existencia de diferentes proteínas que se comportan inmunológicamente como la hormona y biológicamente no actúan como tal.

De los numerosos parámetros que ciertamente podríamos elegir - para esta reinvestigación, hemos escogido el estudio de los componentes insulínicos que normalmente circulan en el animal normal, - así como los cambios de estos componentes en situación de ayuno prolongado; y en una segunda parte hemos querido dedicar nuestra atención preferente a la importancia de los diferentes factores intestitinales en la regulación de la secreción de insulina.

La importancia de estos factores en la regulación de la secreción de la hormona comienza a ser clave en la comprensión del síndrome diabético.

Con motivo del empleo del radioinmunoensayo para determinar los valores de insulina, se ha sabido que numerosas sustancias naturales son capaces de estimular la secreción de la hormona. La concentración de glucosa en la sangre que perfunde el páncreas, considerada durante muchos años como el único regulador fisiológico de la secreción de insulina, sigue manteniendo una situación de privilegio como el factor más determinante de esta regulación. No obstante, ultimamente se viene dando una gran importancia a factores neurales y - hormonales sobre la secreción de insulina en respuesta a la ingestión de comida y en el ayuno prolongado.

Este actualizado interes por el eje intestinal, como factor importante en el aumento de secreción de insulina, deriva principalmente de la observación independiente de tres grupos de investigadores, que puede concretarse así: 1) El aumento de insulina resultante de la hiperglucemia inducida por la glucosa oral es mayor que, el que acompaña a una hiperglucemia semejante producida por la administración de glucosa parenteral (Mc Intyre y col 112,113). 2) La administración de un extracto crudo de mucosa intestinal conteniendo "actividad secretínica", mejora la tolerancia de la glucosa administrada intravenosamente (Dupré 114). 3) El glucagon es un potente estimulador de la secreción de insulina (Candela 115, Samols 116).

Antes de entrar en detalles más concretos sobre el porqué de la importancia de estas observaciones, debemos hacer hincapié de una manera sucinta, (recientes estudios le dedican una grán extensión, Mc Intyre 117)), en la historia de la secreción de insulina inducida por los carbohidratos, tanto en el hombre como en los animales ; para pasar posteriormente a analizar los factores intestinales en relación a la función pancreática.

I.- Secreción de insulina producida por carbohidratos.

a.- En el hombre podemos ver, que bastante antes de que la glucosa pudiera determinarse de una manera concreta, se sabía que la - glucosuria se producía más fácilmente cuando la glucosa se adminis- traba intravenosamente, que cuando se administraba por via oral - (118,119).

Con posterioridad, Lennox (120) y Koehlen (121), y más recien- temente Scow y Cornfield (122), observaron que los valores de glucosa determinados en sangre, eran mas bajos cuando la glucosa se admi- nistraba por vía oral, que al administrarse por vía intravenosa. Es- tos resultados fueron confirmados despues por Mc Intyre y col. (123

), interpretándose como efecto de una mayor secreción de insulina a causa de un estímulo adicional, que era activado en el yeyuno por la administración oral de la glucosa.

No obstante, existe una contradicción entre los resultados de - los autores antes citados y los de Elrich y col. (124), en los Esta- dos Unidos, que no pudieron observar una mejora de las curvas de tolerancia a la glucosa, cuando se administraba en forma oral, pese a comprobar un aumento mayor en la secreción de insulina.

Un factor a tener en cuenta que quizá sea bastante clave en la discrepancia de los resultados, pudiera ser la circunstancia de que los últimos autores administraron la glucosa oral, mientras que en

los demas trabajos descritos se realiza en forma intrayeyunal.

Pero, con probabilidad, el hecho más convincente de la importancia del tracto alimenticio en la regulación de la secreción de insulina, sea el resultado obtenido con la galactosa. Este azucar, que participa del mismo mecanismo de transporte en el intestino que la glucosa, es un poderoso estimulante de la secreción de insulina cuando se administra por vía intestinal, pero carece de efecto al administrarse intravenosamente (125). La fructosa, por el contrario, causante de una elevación mas considerable de la glucemia que la galactosa, es incapaz de producir secreción de insulina, ya se administre por vía oral ó intravenosa; hecho que se debe posiblemente a su no participación del mismo mecanismo de transporte que la glucosa y galactosa.

b.- En los animales: Hay que tener sin embargo en consideración la existencia de importantes diferencias de especie en cuanto a la cantidad de secreción de insulina obtenida despues de la administración de glucosa oral; y así como hemos visto que esto es un hecho - demostrable en el hombre, es mucho menos convincente en el perro - (126) ó en el pato (127). En el perro, Seltzer y Mc Neff en 1967 llegaron a la conclusión de que "la secreción de insulina estaba en relación directa con los valores de glucosa en la sangre arterial", - careciendo de importancia la vía por la que se administraba.

Las razones de estos hallazgos, por el momento son poco claras, pero bien pudieran reflejar diferencias en los hábitos dietéticos, ó quizá tambien diferencias en la morfología intestinal.

II.- Secreción de insulina producida por proteínas y aminoácidos.-

Aunque quizá por razones puramente históricas, se ha dado mayor importancia a los carbohidratos como reguladores de la secreción de insulina, se va teniendo gran evidencia de una acción similar (probablemente interdependiente, pero no necesariamente idéntica), sobre el aumento de la secreción de insulina producida por la ingestión de proteínas y de aminoácidos (128), y tambien posiblemente, por la administración de grasas (125).

La respuesta insulinémica a los aminoácidos, tal vez no sea totalmente independiente de otros factores nutritivos, como se demuestra por la observación de Ajdkiewicz y col. (129), que el considerable aumento de insulina obtenido despues de una comida, en respuesta a la administración oral de triptófano, es un hecho que desaparece al administrarse el triptófano en ayunas, lo que ha llevado a sugerir a este autor que la eliminación de glucagón puede ser un factor importante en este eje.

III.- Factores humorales en el control de la secreción de insulina:

Hormonas intestinales.

Como hemos visto, el papel del intestino en la regulación de la secreción de insulina adquiere una importancia considerable, y el mecanismo por el cual se regula esta secreción es completamente desconocido.

Aunque parece ser que intervienen varios mecanismos (humorales neurales, circulatorios y reflejos), es el factor humoral al que mayor importancia se va concediendo; es decir, serían una ó mas sustancias segregadas por la mucosa intestinal, como respuesta principalmente a la ingestión de alimentos, las que regularían la secreción de insulina.

Esto nos lleva a no olvidar que el tracto gastrointestinal es el mayor órgano endocrino y probablemente, el más complejo, digno rival de la hipófisis. De todas formas, nunca ha sido considerado así por los endocrinólogos, a pesar de conocerse en la actualidad unas seis sustancias, por lo menos, con actividad hormonal (secretina, colecistokinina-pancreocimina (CCK), gastrina, enteroglucagon, villikinina y serotonina (130), y de la probabilidad de que existan algunas mas.

Aunque han sido investigadas las propiedades químicas y farmacológicas de varias de estas hormonas gastrointestinales, su fisio-

logía es desconocida casi totalmente, así como los trastornos fisiológicos producidos por un exceso o falta de secreción.

Nosotros vamos a considerar muy específicamente la secretina y la colecistokinina-pancreozimina.

a) Secretina.—

La secretina fue la primera sustancia que recibió el nombre de hormona y ha sido estudiada extensamente (130 - 131).

Debido a no haberse obtenido preparaciones puras hasta muy recientemente, los trabajos antiguos carecen de rigor científico. No obstante, pueden sacarse algunas conclusiones de ellos. Y así las observaciones obtenidas entre los años 1902 y 1940 indican que extractos parcialmente purificados de intestino con "actividad secretínica", tenían capacidad para producir hipoglucemia en el hombre y en los animales.

En el año 1940, Loew y col. (132) publicaron un trabajo, donde demostraban que todo lo anterior no resultaba cierto y que extractos de intestino bastante purificados eran incapaces de producir hipoglucemia, por lo que la posible existencia de un factor hipoglucemiante en el intestino era una falacia.

Ante tal afirmación, la investigación en este campo decayó completamente. Y es veinticuatro años más tarde, cuando de nuevo recobra interés este asunto, debido a un importante trabajo de Dupré (114).

Este autor demuestra que la secretina "cruda" aumenta la asimilación de la glucosa administrada intravenosamente en personas normales, - aunque carece de efecto sobre los valores basales de glucosa.

Este trabajo fue confirmado posteriormente, administrando secretina sintética y natural.

a-I) Estructura química y función fisiológica.

La secretina ha sido aislada del intestino del cerdo en su forma pura, y determinada su estructura primaria (133).

Químicamente, es una hormona polipeptídica de cadena simple, compuesta de veintisiete residuos de aminoácidos. No menos de catorce, de estas veintisiete unidades de aminoácidos, ocupan en la secretina la misma posición que en el glucagón (que tiene veintinueve residuos de aminoácidos); y por tanto, no es de extrañar que posean - en común algunas propiedades biológicas.

Parece ser que pueden existir pequeñas diferencias en la estructura química y actividad biológica, entre la hormona de diferentes especies animales, pero sobre esto no hay información suficiente hasta el momento.

La acción mas conocida de la secretina es favorecer la secreción de agua y bicarbonato por el páncreas exocrino, y esta es la base - para determinar su actividad biológica (134).

La actividad biológica de la secretina pura es aproximadamente

de unas 20 U clínicas (Unidades IVI perro) ó 400 U Hammarsten (Unidades gato)/mg.

Bodanszky y col. (135) han preparado secretina sintética con - I/10 de la actividad biológica de las mejores preparaciones de secretina natural.

Aparte de otras consideraciones fisiológicas importantes de la secretina lo que más nos interesa dentro de nuestro planteamiento - experimental, es su relación con la secreción de insulina.

a-2) Estimulación de la secreción de insulina "in vitro" por - la secretina.

En 1965, Mc Intyre y col. en Londres (113 -112), y Pfeiffer - en Frankfurt (136), describieron independientemente la estimulación por la secretina "cruda", de la secreción de insulina "in vitro". Los resultados de Mc Intyre no se pueden tener muy en cuenta, dada la contaminación de su preparado por glucagón e insulina.

Turner en 1969, a su vez, incubando "in vitro" piezas de páncreas de conejo, observó como el efecto estimulante de la secretina "cruda" sobre la secreción de insulina, dependía de la concentración de glucosa presente en el medio de incubación (137).

A los resultados anteriores hay que añadir los últimos trabajos realizados por Buchanan y col. (138), según los cuales, la secretina no estimula la secreción de insulina en preparaciones de islotes

aislados; y los resultados de S S Lazarus y col. (139) según los cuales fragmentos de páncreas de rata que responden a otros estímulos, no lo hacen a la secretina a concentraciones de 1,25 U/ml de medio de incubación.

Estos hallazgos y los de Turner, se enfrentan con los resultados de Pfeiffer y col. (136). La razón de estas discrepancias actualmente no es explicable. Sin embargo, no hay que olvidar, que ciertas - características biológicas de las hormonas intestinales difieren según actuen a altas ó bajas concentraciones, tanto "in vivo" como - "in vitro". En este sentido es muy interesante el trabajo de Guidoux-Grassi y Felber (140), quienes observaron como la secretina estimula la secreción de insulina en el páncreas de rata "in vitro", esta secreción se inhibe, si, ligando previamente los conductos pancreáticos el tejido acinar se transforma en tejido graso.

a-3) Estimulación de la secreción de insulina "in vivo", por la secretina.

Los numerosos trabajos realizados con el fin de estudiar el efecto de la secretina sobre la secreción de insulina en el animal vivo, han dado lugar a diferentes resultados.

Dupré y col. (141) y Unger y col. (142) utilizando un extracto crudo de mucosa intestinal con actividad secretínica, observaron en perros un aumento rápido, aunque pasajero, de la concentración de -

insulina en la sangre de la vena pancreatico-duodenal, acompañado de una elevación de la glucosa en la sangre arterial. En los animales que recibieron secretina pura, el aumento de la concentración de in sulina fue mayor, aunque por el contrario fue menor la variación de la glucemia.

Por su parte Dupre y col. (141), despues de la administración de secretina a humanos, tambien observaron una elevación pasajera - de los niveles de insulina en sangre; pero en este caso no hubo nin guna alteración de la glucemia ni de los niveles de glucagón en san gre.

En esta línea de pensamiento, y con relativa poca discrepancia (cambios en los valores glucémicos), encontramos una serie de traba jos en la literatura, como son los de Deckert (143), Bottermann y - col. (144), Nelson y col. (145) y Jarrett y Cohen (146), entre otros.

En todos los resultados hay que destacar, pues, que el aumento de insulina es considerable, pero efímero.

De todo esto se desprende algo claro, y que parece importante en nuestros objetivos: el hecho de que ningún autor de los citados anteriormente ha podido describir, a pesar del aumento de insulina, una concomitante hipoglucemia.

a-4) Efecto de la secretina endógena sobre la secreción de insulina

Los intentos que se han realizado (acidificación de la mucosa

duodenal) con el fin de mejorar las curvas de tolerancia a la glucosa, ó para aumentar la secreción de insulina por medio de una elevación en la producción de secretina endógena, en su mayor parte han resultado inútiles.

No obstante Dupre y col. (147), usando como estimulante para la secreción endógena de secretina ácido clorhídrico, observaron un efecto insulínico sobre la glucosa inyectada intravenosamente, y una mejora de la tolerancia a la glucosa. Este trabajo ha sido muy criticado, especialmente por Jarrett y Cohen, al considerar que las dosis de ClH administradas no corresponden a los valores fisiológicos. Young y col. (148), en un trabajo publicado en 1968, describen un aumento de la secretina después de la administración de glucosa intraduodenal. Aunque estos resultados no están de acuerdo con los trabajos publicados anteriormente por Wang y Grossman (149), y por Ramirez y col. (150), el hecho, posiblemente, se deba al empleo por Young de un radioinmunoensayo muy preciso y sensible para la valoración de la secretina.

De todo lo expuesto sobre el efecto de la secretina en la secreción de insulina, se deduce, la imposibilidad de determinar, por el momento, su fisiología. Existe una clara discrepancia entre su falta de efecto en las preparaciones artificiales "in vitro", y la estimulación efímera, pero sustancial, de insulina en el animal vivo,.

b) Cholecistokinina - Pancreocimina.

Otra de las hormonas intestinales importante en la regulación de la secreción de insulina, es la cholecistokinina-pancreocimina.

Durante varias generaciones, los fisiólogos distinguieron dos fracciones hormonales que actuaban principalmente sobre la vesícula biliar y el páncreas, y que denominaron respectivamente colecistokinina y pancreocimina. En la actualidad se sabe que estas dos sustancias representan en realidad propiedades biológicas distintas - del mismo compuesto.

b-I) Estructura química y función fisiológica.

Químicamente, la pancreocimina (nombre que vamos a dar a esta sustancia), es una hormona polipeptídica compuesta de 33 aminoácidos (151). Su origen y la distribución en el cuerpo humano, sigue el mismo patrón que el de la secretina, de quien se puede separar por simples métodos químicos. Sus acciones farmacológicas más conocidas son, la contracción de la vesícula biliar y la secreción de los enzimas pancreáticos; y son la base para la determinación de su actividad biológica.

El material más puro obtenido tiene una actividad de 3 U "Ivy perro" (colecistokinina) ó de 12 U "Crick-Harper" (pancreozimina)/ μ g siendo por tanto, 100 á 600 veces mas potente que las preparaciones crudas de pancreocimina obtenidas en el pasado, y que desgraciadamente

han suministrado la mayor parte de los conocimientos biológicos sobre esta hormona.

El mayor estímulo para su secreción parece ser la entrada en el duodeno de proteínas, polipéptidos y aminoácidos, ó la de grasas y ácidos grasos. Las soluciones simples de azúcares, como glucosa y galactosa, se cree que no producen estimulación de pancreozimina aunque actualmente parecen plantearse ciertas dudas al respecto

Estas observaciones dan fuerza a los recientes trabajos de Young y col. (148), quienes describen un aumento en la concentración de pancreozimina (medida por radioinmunoensayo) en personas normales, a los que se ha administrado gran cantidad de glucosa por boca.

b-2) Estimulación de la secreción de insulina "in vitro", por la pancreozimina.

La estimulación de la secreción de insulina en páncreas incubado "in vitro", por la pancreozimina, es poco clara. N. R. Lázarus y col. (152) observaron cómo la pancreozimina no tiene efecto sobre la secreción de insulina, sin que afectaran esta respuesta diferentes concentraciones de glucosa en el medio de incubación.

Malaisse y Malaisse-Lagae (153), también describieron un efecto negativo de la pancreozimina sobre islotes aislados de rata. Resultados idénticos han sido publicados por Buchanan y col. (138). Turner (137), por su parte, encontró, que si bien la concentración de glucosa

en el medio de incubación no influía en el efecto negativo de la -
pancreozimina (0,5 μ g/ml) sobre la secreción de insulina, en fragment
tos de páncreas de conejo "in vitro", la hormona instestinal era capaz
de estimular la secreción de insulina en presencia de leucina,

Los únicos investigadores que han descrito resultados positivos
son Pfeiffer y Telib (154).

b-3) Estimulación de la secreción de insulina "in vivo", por -
la pancreozimina.

La acción insulinoestimulante de la pancreozimina "in vivo", fue
estudiada por primera vez por Dupre (114) y Dupre y Beck (155), quien
es observaron cómo la pancreozimina, en contra de lo descrito para
la secretina, no producía en el hombre alteraciones en las curvas de
tolerancia a la glucosa intravenosa, ni estimulaba la secreción de
insulina. Aunque estos trabajos fueron confirmados por Boyns y col.
(156) en 1967, experimentos posteriores en muchos centros experiment
ales han demostrado una secreción de insulina considerable despues
de la administración de pancreozimina, tanto en el hombre como en -
animales de experimentación (142 -157 -158). Es difícil explicar,
por el momento, el porqué los primeros experimentos descritos fueron
negativos, pero probablemente la falta de respuesta sea debida a las
diferentes concentraciones de pancreozimina empleada.

b-4) Efecto de la pancreeozimina endógena sobre la secreción de insulina.

Como en el caso de la secretina, es difícil en este momento de terminar la importancia fisiológica y clínica que esta hormona intestinal puede tener en el control de la secreción de insulina. No obstante la glucosa no es un estímulo importante en su secreción (112, 124).

Las proteínas, por otra parte, pueden producir secreción de pancreozimina, y esto sí tiene importancia, ya que entonces la pancreozimina actuaría como mediador, estimulando la secreción de insulina después de este tipo de alimentación (128), y especialmente cuando se ingieren como parte de una dieta carbohidratada (159).

Sin embargo, no ha sido posible demostrar experimentalmente diferencias en la respuesta insulinogénica a los aminoácidos administrados por vía oral ó intravenosa, (158).

En contraste con la arginina (que es el más insulíntrófico e hiperglicémico de todos los aminoácidos)(160), las proteínas naturales, cuando se toman por boca, no producen alteraciones en la glucemia, y son poco estimulantes de la secreción de insulina (161).

También hay que tener en consideración, cómo los triglicéridos, cuando se administran por vía oral, en el hombre, son potentes estimuladores de la secreción endógena de pancreeozimina, pero no estimulan

la secreción de insulina (162).

Parece claro, pues que la pancroezimina debe tener un papel me
nos importante que la secretina en la regulación de la secreción de
insulina, siendo quizá mayor su importancia en presencia de hiperglici
cemia.

B.- OBJETIVOS

De todo lo anteriormente expuesto, está claro, pues, que el intestino delgado debe ser considerado como un órgano endocrino por derecho propio, y tiene una importancia decisiva en el control de la secreción de insulina.

Podemos deducir, que las hormonas intestinales secretina y pancreozimina, de alguna forma hoy desconocida, regulan o ayudan a modular la respuesta de las células β a la ingestión de comida.

Respecto de la secretina, tres hechos destacan claramente:

- 1.- Su secreción después de la administración de glucosa por vía oral
- 2.- La falta de capacidad hipoglucémica del aumento de insulina producido por la secretina, hecho en sí paradójico.
- 3.- La acción insulínica de la secretina, cuando se administra en el animal vivo, y su falta de acción sobre preparaciones artificiales "in vitro".

Todo esto hace que no tengamos más remedio que estudiar el "porqué" de esta falta de acción hipoglucémica, y por tanto uno de los pensamientos fundamentales que vienen a nuestra mente, es que, en realidad no sea verdadera insulina la hormona secretada, sino una hormona que mas bien se comporte inmunológicamente como la insulina, pero difiera biológicamente de ella, tratándose de proteínas del tipo de la -

proinsulina (Big insulin) ó similares, desconocidas hasta ahora.

Si esta manera de pensar resulta cierta, los componentes inmunológicos insulínicos, secretados despues de la administración de la pancreozimina, deben de ser distintos, principalmente debido a que la falta de hipoglucemia concomitante que se observa despues de la administración de esta hormona, es debida probablemente a la estimulación de la secreción de glucagón, que a su vez, sería un estimulante de la secreción de insulina.

Tambien es interesante comparar los componentes inmunológicos insulínicos obtenidos despues de la administración de estas hormonas tras diferentes periodos de ayuno, ya que esta situación modifica la estructura de las células β y por tanto, es muy posible que como consecuencia tambien se modifique la respuesta de la secreción de insulina.

Muy importante es estudiar la calidad de los componentes insulínicos inmunorreactivos secretados despues de la administración de glucosa oral, ya que si es cierto que produce secreción de secretina, la calidad de estos componentes debe ser similar.

Tambien es de gran interés comparar la respuesta a la glucosa intravenosa, que sigue siendo el estímulo fisiológico por excelencia.

La tolbutamida actúa eliminando los gránulos de secreción en deposito y la insulina sintetizada "de novo", por lo que los resul-

tados deberían ser similares a los de la glucosa y glucagón, del que no sabemos su mecanismo de acción sobre la célula (activación del - sistema Adenil Ciclasa).

Por todo lo anteriormente expuesto, hemos planteado el estudio de los componentes insulínicos inmunorreactivos en el plasma de la sangre portal de conejos canulados.

Hemos elegido el conejo como nuestro animal de experimentación considerando que ha sido, junto con la rata, el animal más estudiado en la investigación de la secreción de insulina, tanto "in vivo", - como "in vitro".

La idea de utilizar sangre portal, viene determinada por la necesidad de hacer un estudio en la sangre que vierte directamente - del páncreas, y evitar así la barrera hepática, que sabemos tiene - gran importancia en el "aclaramiento" insulínico del plasma.

Canular los conejos nos ha permitido hacer el estudio en animales recuperados, evitando por tanto, en lo posible el stress quirurgico y los efectos inhibidores producidos por la anestesia, sobre - la secreción de insulina.

Empleamos la Dihidroergotamina porque bloquea la secreción de aminos y estabiliza las glucemias (163), con la cual obtenemos unas condiciones óptimas.

C.- SITUACIONES INVESTIGADAS.

I) Hemos estudiado las siguientes situaciones experimentales:

Grupo I.- Animales en condiciones basales (24 horas de ayuno)

Grupo II.- Animales en ayuno prolongado (48 horas)

Grupo III.- Animales en ayuno de 24 horas y estimulados con glucagón

Grupo IV.- Animales en ayuno de 24 horas y estimulados con tolbutamida

Grupo V.- Animales en ayuno de 24 y 48 horas y estimulados con secretina

Grupo VI.- Animales en ayuno de 24 y 48 horas y estimulados con pancreocimina

Grupo VII.- Animales en ayuno de 24 horas y estimulados con glucosa intravenosa

Grupo VIII.- Animales en ayuno de 24 horas y estimulados con glucosa oral

II) Aislamiento y caracterización cromatográfica e inmunológica de los componentes insulino- inmunorreactivos circulantes en el plasma del conejo.

MATERIALES Y METODOS

A.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

En todos los experimentos hemos utilizado conejos domésticos de ambos sexos, y de pesos comprendidos entre 1.5 y 2.5 kg. Previamente a los experimentos, los animales permanecieron en nuestro criadero un mínimo de siete días, alimentados con una dieta sintética equilibrada y elaborada especialmente para animales de laboratorio.

B.- PREPARACION DE LOS ANIMALES.

Después de un ayuno de 24 ó 48 horas (según el grupo experimental), y durante el cual los conejos tienen libre acceso al agua, se les inyecta en la vena marginal de la oreja una dosis de 0.3 mg/ kg de peso de Dihidergot, con el fin de prevenir el efecto hiperglucémico de la anestesia (163). Cinco minutos después se les anestesia con eter, y previa laparotomía abdominal, se busca la vena porta, canulándose una de sus ramas inmediatamente antes de penetrar en el hígado. El catéter de polietileno se inserta en dirección contraria al flujo venoso sanguíneo, se estabiliza su posición y se mantiene permeable durante todo el tiempo requerido para el experimento, mediante una instilación local de una solución muy diluida de heparina.

La duración de la intervención quirúrgica es aproximadamente de unos

diez a quince minutos. Una vez finalizada, se deja que los animales se recuperen totalmente un mínimo de cinco a seis horas.

El procedimiento quirúrgico es perfectamente tolerado; se desecharon aquellos animales que no se recuperaron bien, y aquellos que durante la intervención tuvieron hemorragia de mediana intensidad, que hubiera podido influir en los resultados del experimento.

En todos los animales se toma oportunamente una muestra de sangre para la determinación del valor hematocrito, sin que se observaran alteraciones .

Las muestras de sangre para los experimentos se tomaron de acuerdo con el estudio planeado, bien en condiciones basales (ayuno de 24 y 48 horas), ó bien tras el estímulo a estudiar.

La sangre de la vena porta se extrae con una jeringa, previamente lavada con una solución diluida de heparina, se pone en tubos y se centrifuga a 4°C dentro de la media hora siguiente, a 3000 rpm durante 15 minutos.

El plasma obtenido se divide en alícuotas y se guarda a -20°C, hasta su posterior valoración. Los plasmas nunca se descongelan más de una vez.

Después de finalizado el experimento, fueron sacrificados los animales, y la necropsia indicó ausencia de hemorragia y la buena canulación conseguida.

C.- PRODUCTOS UTILIZADOS COMO ESTIMULOS INSULINOGENICOS. VIA DE ADMINISTRACION Y DOSIS EMPLEADAS.

Para este estudio hemos utilizado los siguientes productos:

I.- Glucosa pura cristalizada de la casa Merk, que disolvimos oportunamente en agua destilada o en solución salina, según la vía de administración empleada.

Para la vía oral, la glucosa se administró por catéter intragástrico, a una dosis de 1 gr/Kg de peso, disuelta en 10 ml. de agua destilada. Para la vía parenteral se administró la glucosa a una dosis de 0,5 gr/Kg de peso, disuelta en 3 ml de solución salina, por inyección intravenosa en la vena marginal de la oreja.

2.- Glucagón, obsequio de la casa Novo, envasado en viales liofilizados, conteniendo cada vial 1 mg de la hormona, que se disuelve en solución salina inmediatamente antes de su uso.

La dosis administrada fue de 100 μ U/Kg de peso por inyección intravenosa en la vena marginal de la oreja.

Las pequeñas cantidades de lactosa que este preparado de glucagón contiene, no afectan para nada el estudio realizado.

3.- Tolbutamida (Rastinon), obsequio de Hoechst, que viene en ampollas estériles, conteniendo cada ampolla 1 mg de N- [-metil-benzolsulfonil-] -N'-butil-urea (en forma de sal sódica), a una concen

tración de 50 mg/ ml.

La dosis administrada fué de 50 mg/ kg de peso, por inyección intravenosa en la vena marginal de la oreja.

4.- Hormonas intestinales:

(4-a).- Secretina altamente purificada. Se obtuvo del Prof. Erik Jorpes del Karolinska Institutet, Stockolm, Suecia. Se estima que contiene de 4.330 a 17.500 U/ mg (164). Viene en viales liofilizados, conteniendo cada vial 75 U clínicas. Lotes 16911 y 17041.

El contenido de cada vial se disolvió en 10 ml de solución salina inmediatamente antes de su uso (concentración de 7.5 U/ ml).

La dosis utilizada fué de 1.5 U/ kg de peso.

(4-b).- Pancreocimina- Cholecistokinina, altamente purificada, procedente también del Prof. Erik Jorpes. Se estima que contiene 6.000 U/ mg (164). Viene en viales liofilizados, conteniendo cada vial 300 U. Lote 26912.

El vial se disolvió antes de su uso en 10 ml de solución salina (concentración 30 U/ ml)

Se utilizaron dosis de 100 U/ conejo.

Tanto la secretina como la pancreocimina, se administraron por vía intravenosa, en la vena marginal de la oreja.

D.- OTROS PRODUCTOS UTILIZADOS.

I.- Preparaciones cristalizadas:

- a.- Insulina cristalizada de origen bovino, libre de glucagon. Lote BJ- 4609.
- b.- Proinsulina cristalizada de origen porcino. Lote 615- 1039 B 220 - C.
- c.- Péptido C cristalizado de origen porcino secuencia 33- 61. Lote 615- 1039- B 66 - A.

Estos productos fueron un obsequio generoso del Dr D.E. Chance de Lilly Research Laboratories, Indianapolis U.S.A.

II.- Productos químicos:

- a.- Dihidergot de la casa Sandoz. Viene en ampollas de 1 ml, y cada ampolla contiene 1 mg de metasulfonato de dehidroergotamina.
 - b.- Eter etílico para narcosis, de Abello.
 - c.- Heparina (sal sódica grado 1) de Sigma, conteniendo 170 USP Unidades/ mg. Lote 79 B - 1610.
- 1 mg de Heparina se disuelve en 30 ml de solución salina.

E.- VALORACION DE LAS GLUCEMIAS.

Utilizamos el método colorimétrico de Somogyi-Nelson para azúcares reductores (165), basado en la oxidación del azúcar en presencia de Cu^{++} en medio alcalino. La valoración posterior del óxido cuproso se realiza con el reactivo arsenomolibdico de Nelson (166).

El método en sí requiere una desproteinización previa, para eliminar la incompatibilidad analítica de las proteínas.

(E-I).- Desproteinización:

Reactivos:

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 %
$\text{Ba}(\text{OH})_2$	0,3 N

Estas dos soluciones son equivalentes 1:1, usando fenolftaleína como indicador.

Procedimiento:

A 0,2 ml. de plasma se añade 0,4 ml. de SO_4Zn y 0,4 ml. de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y se completa el volumen a 3 ml con agua destilada. Se agita y filtra para obtener un líquido claro.

(E-2).- Valoración de la glucosa:

a) Reactivos de Somogyi:

28 gr. fosfato disódico anhidro	por litro
4 gr. hidroxido sódico	"

40 gr. tartrato sódico potásico por litro

8 gr. sulfato de cobre "

180 gr. sulfato sódico anhidro "

La solución se deja reposar durante 24 horas para sedimentación de las impurezas. Se filtra y es guardada en cámara a 37°C en frasco topacio.

b) Reactivos de Nelson:

Se disuelven 25 gr. de molibdato amónico en 450 ml. de agua - destilada. Se añaden 21 ml. de H_2SO_4 concentrado, enfriando el matraz exteriormente con hielo. Son disueltos 3 gr. de arseniato sódico cristalizado con $7.H_2O$ en 2 ml. de agua destilada. Se mezclan las dos soluciones, y se dejan en cámara a 37°C durante 48 horas en frasco - topacio.

c) Procedimiento:

A 0,5 ml. del filtrado libre de proteínas, añadimos 0,5 ml. de reactivo de Somogyi y se hierve durante 15 minutos. Después de enfriar se añaden 0,5 ml. de reactivo de Nelson. Se agita hasta quedar clara la solución y se completa hasta un volumen de 10 ml. con agua destilada. El color (más ó menos azul), que aparece inmediatamente después de añadir el reactivo de Nelson, es estable durante horas. Las lecturas son realizadas en un espectrofotómetro Beckman, modelo D.U. a - 500 mμ de longitud de onda.

La solución patrón de glucosa contiene 450 mg. de glucosa (Merk) y 120 mg. de ácido benzoico (Merk) en 100 ml. de agua destilada.

F.- FRACCIONAMIENTO PROTEICO DE LOS PLASMAS.

De acuerdo con Roth y col. (108), el fraccionamiento proteico de los plasmas lo realizamos por cromatografía, utilizando geles de sephadex.

(F-I).- Consideraciones teóricas:

El sephadex es un dextrano que contiene grupos hidroxilos, por lo cual en contacto con el agua se "hincha" considerablemente, dando lugar a un gel que fracciona y separa las distintas moléculas de acuerdo con su tamaño y peso molecular.

Las moléculas de un tamaño mayor que los poros del sephadex - "hinchado" no pueden penetrar en las partículas del gel, y por lo tanto pasan a través de éste junto con la fase líquida, siendo eluidas en primer lugar. No obstante, las moléculas de tamaño menor penetran en las partículas del gel a diferentes profundidades, dependiendo de su tamaño y configuración, por lo que la mezcla a separar eluye en relación directa al tamaño molecular de los diversos componentes.

Cada tipo de sephadex fracciona principalmente dentro de un orden particular de pesos moleculares, determinado por el grado de "hinchamiento" del gel. Las moléculas de un peso molecular mayor que el límite superior de este orden (límite de exclusión) son totalmente

excluidas del gel, eluyendo con el volumen vacío, por el contrario, las partículas de peso molecular inferior a este orden eluyen aproximadamente en un volumen igual al volumen total de la columna (entiéndase que al hablar de columna nos referimos al volumen del gel, nunca al del tubo de vidrio donde éste se empaqueta).

(F-2).- Materiales:

-Sephadex G-50 fino (Pharmacia, Uppsala, Suecia, lote 8930).

Este tipo de sephadex tiene las siguientes características: tamaño de la partícula = $20 - 30 \mu$; agua recuperada por gramo de sephadex seco = 5.0 ± 0.3 gr.; volumen del gel por gramo de sephadex seco = 10 ml.; orden de fraccionamiento = 1.500 a 30.000.

-Columnas de vidrio de 1 x 60 cm.

- Tampón eluyente. Ya que la concentración de sales puede influir en el desarrollo posterior del inmunoensayo, las columnas se equilibraron y eluyeron con el mismo tampón utilizado en el inmunoensayo: tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6) adicionado con albúmina humana al 0.25%.

(F-3).- Preparación del sephadex y empaquetamiento de las columnas:

En un vaso de precipitados conteniendo 8 gr. de sephadex, se añaden 250 ml. de agua destilada, mientras se agita con una varilla. Se deja en reposo y a temperatura ambiente un mínimo de 5 a 6 horas. Una vez que el gel está completamente "hinchado", se decanta una parte

del agua sobrenadante, se agita bien, teniendo cuidado de no formar burbujas, y se procede al empaquetamiento de la columna.

El procedimiento de llenar una columna no ofrece ninguna dificultad. Ahora bien, es condición importantísima que éste se haga de una manera correcta, teniendo cuidado de que no queden burbujas de aire en el interior del gel, y de que el empaquetamiento sea homogéneo. Cualquier alteración de estas condiciones puede influir posteriormente sobre la buena marcha de las cromatografías.

(F-4).- Equilibración de las columnas:

Una vez empaquetada la columna, se lleva a cámara fría a 4°C, donde se deja equilibrar un día, eluyendo con tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6) adicionado con albúmina humana 0.25%.

La altura final alcanzada por el gel en la columna debe de ser 50 cm.. Las columnas más cortas no tienen buen poder de separación.

(F-5).- Calibración de las columnas:

Se hace aplicando a la columna 1-3 ml. de plasma normal de conejo, previamente incubado durante la noche anterior a 4°C con Insulina-I¹²⁵. Una vez que el plasma desaparece dentro del gel, la columna se eluye con el tampón eluyente. Se toman fracciones de 1 ml. - que posteriormente son valoradas por D.O. a 275 mμ de longitud de onda en un espectrofotómetro Beckman (modelo DB), y por radioactividad en un contador Tricarb de radiación Gamma (modelo 3002).

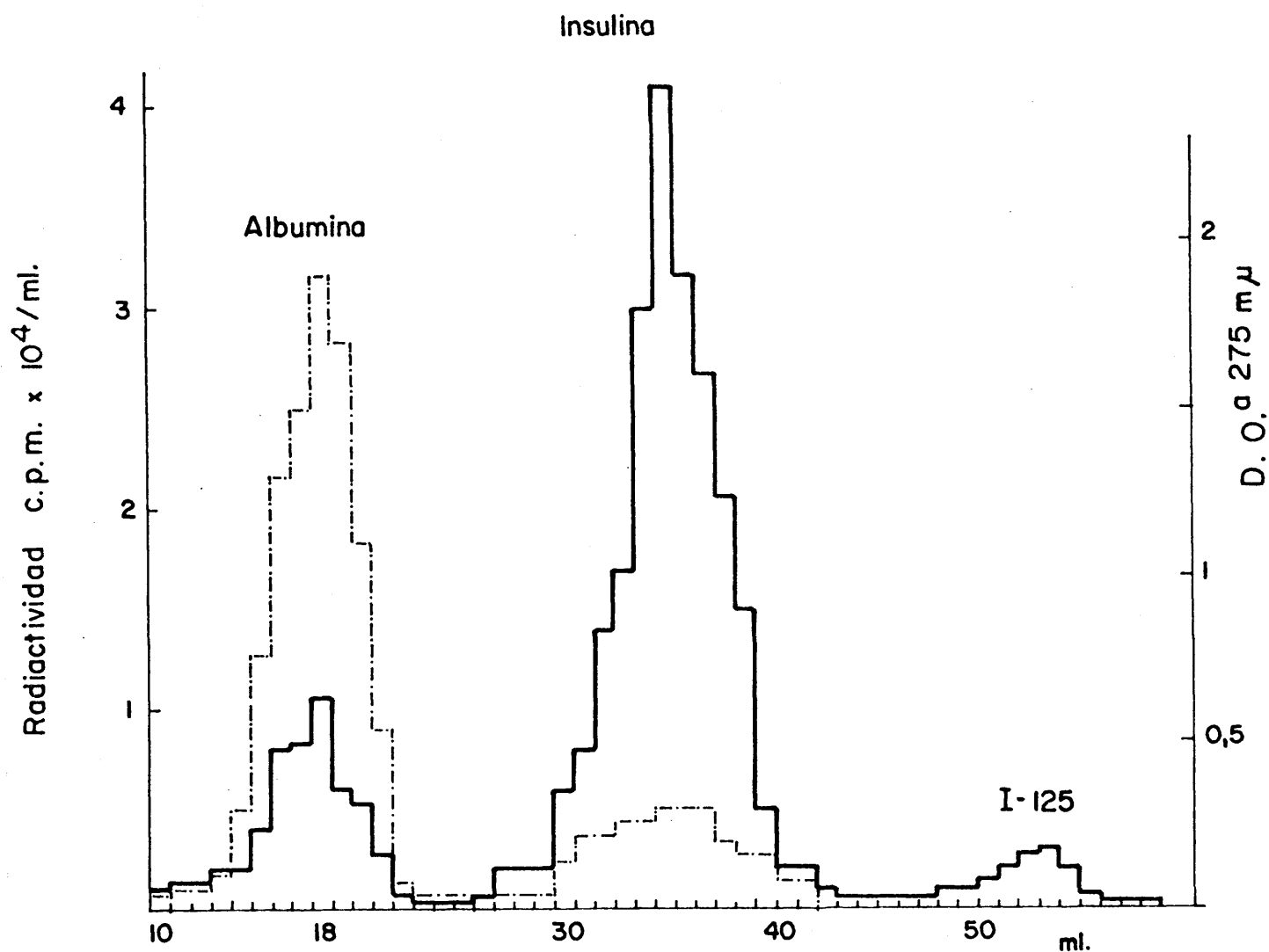


FIGURA 1.- Calibración de una columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm).

1 a 3 ml de plasma normal de conejo incubado a 4°C con una alícuota de insulina- I^{125} se filtra por la columna. Se colectan fracciones de 1 ml que se valoran por radioactividad (cpm/ ml) y por D.O. a $275 m\mu$ de longitud de onda en cubetas de 1 cm de paso de luz.

— Radioactividad. - - - - - D.O.

Fracciones 10 a 21.- Volumen de elución de la albúmina plasmática

Fracciones 30 a 40.- Volumen de elución de la insulina- I^{125}

Fracciones 53 a 56.- Volumen de elución de las sales plasmáticas.

Para la obtención de las fracciones hemos utilizado un colector de fracciones automático (modelo Gilson). Este trabajo se ha realizado siempre en cámara fría a 4°C y a un flujo constante de 10 ml/hora

La figura nº I muestra la calibración de una columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm.). Se observan los volúmenes de elución de las proteínas plasmáticas de alto peso molecular (albúmina I^{125}), de la insulina I^{125} y de las sales (Iodo 125). Las primeras eluyen en el volumen vacío, y las sales en un volumen aproximado al volumen - total de gel.

La insulina I^{125} añadida al plasma se recoge en las fracciones nº 30 al 40, ambos inclusive.

De acuerdo a este patrón de elución, las valoraciones por la técnica de inmunoensayo de los componentes insulínicos en los plasmas procedentes de las distintas situaciones experimentales estudiadas, se efectuó, valorando cada una de las fracciones comprendidas entre la salida de la albúmina y las sales.

G.- VALORACION INMUNOLOGICA DE LA INSULINA.

La valoración inmunológica del contenido de insulina en las fracciones procedentes del fraccionamiento proteico de los plasmas, así como de la concentración total de insulina en los plasmas no fraccionados, ha sido realizada por una técnica inmunológica basada en el método original de Yalow y Berson(167), adaptada a nuestras posibilidades con la introducción de modificaciones adecuadas, consistentes principalmente en:

- I.- Marcaje de la insulina con I^{125} .
- 2.- Purificación de la hormona marcada por cromatografía en geles de sephadex.
- 3.- Separación de la insulina- I^{125} libre, del complejo insulina I^{125} - anticuerpo, por cromatografía en papel Whatman 3 MM a temperatura ambiente.

Desarrollo de la técnica.-

(G-I).- Marcaje de la insulina con I^{125} :

(G-Ia).- Consideraciones teóricas.- El isótopo seleccionado para el marcaje de la insulina es el yodo radioactivo (I^{131} ó I^{125}), que puede introducirse fácilmente en las proteínas que contienen tirosina o histidina, sin producir alteraciones graves en su reactividad inmunológica.

Si bien Yalow y Berson utilizan en su técnica original la hormona marcada con I^{131} , nosotros hemos utilizado el I^{125} que nos permite obtener insulina radioactiva con gran actividad específica que podemos utilizar para numerosas pruebas durante un periodo de más de dos meses.

Para el marcaje hemos seguido basicamente el procedimiento de Greenwood, Hunter y Glover (168), por medio de la cloramina T.

Los diferentes pasos del método han de ser realizados tan rápidamente como sea posible, para evitar dañar la hormona y limitar el número de átomos de iodo introducidos, que pueden alterar su reacción inmunológica.

G-1b).- Materiales y reactivos.

- 1.- Tampón fosfato sódico 0.25 M (pH 7.5)
- 2.- Tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6), adicionado con albúmina humana 0.25 % (solución de albúmina Hubber al 25 %)
- 3.- Agua acidificada con ClH (pH 2.5)
- 4.- Insulina cristalizada de bovino, libre de glucagón (Lilly. Lote Pj - 4609). Se estima que contiene una actividad biológica de aproximadamente 25 U/ mg.
- 5.- Iodine 125- (Amersham, Inglaterra, Code IMS-3), con actividades específicas de 10 a 15 mCi I^{125} / μ gr. de iodo.
Se trata de ioduro sódico "libre de portador", en solución diluida de NaOH (pH 7-9), libre de agentes reductores.

6.- Cloramina T (Fluka (6, Buch SS 6, Suiza. Lote 112816-28 K).

Este reactivo oxida el ioduro a iodo.

7.- Metabisulfito sódico (Merk). Este reactivo reduce el iodo a ioduro.

(G-1c).- Procedimiento.

Inmediatamente antes de iniciar el marcaje de la hormona, en cámara fría a 4°C y tomando las precauciones debidas para evitar contaminación (el vial conteniendo el iodo¹²⁵ se introduce en en blindaje de plomo), se disuelven la insulina cristalizada y los reactivos, de la manera siguiente:

- 1.- 1 mg de insulina cristalizada se disuelve en 2 ml de agua acidificada (pH 2.5) (concentración 0.5 mg/ ml)
- 2.- 35 mg de cloramina T se disuelven en 10 ml de tampón fosfato sódico 0.25 M (pH 7.5)
- 3.- 24 mg de metabisulfito sódico se disuelven en 10 ml de tampon fosfato sódico 0.25 M (pH 7.5)

Marcaje:

Al vial conteniendo 1 mCi de Iodo¹²⁵ se le añaden con micropipeta y de forma sucesiva:

- 20 µl de tampón fosfato sódico 0.25 M (pH 7.5)
- 5 µl de la solución de insulina cristalizada (concentración final 2.5 µg)
- 10 µl de la solución de cloramina T (concentración final 35 µgr)

-50 μ l de la solución de metabisulfito sódico (concentración final 120 μ gr.).

Se mezcla bien y se procede a la purificación.

(G-2).- Purificación de la insulina I¹²⁵.

(G-2a).- Consideraciones teóricas.— Antes de su purificación, la mayor parte de las preparaciones de insulina marcada contienen - componentes radioactivos que se unen y desplazan, no específicamente con las seroproteínas (37). Estos componentes representan productos degradados o dañados durante el procedimiento de marcaje, y se pueden separar casi completamente por diversos procedimientos (169).

La degradación puede producirse por irradiación, sobreyodación u oxidación de la proteína.

Nosotros, a diferencia de Yalow y Berson que utilizan columnas de celulosa, hacemos la purificación de la hormona marcada por cromatografía en geles de sephadex G-50 fino, que ofrecen como ventajas la rapidez y facilidad de realización.

(G-2b).- Materiales:

- 1.- Tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6) adicionado de albúmina humana 0.25%
- 2.- Sephadex G-50 fino. (Pharmacia, Uppsala, Suecia. Lote 8930)

Este tipo de sephadex posee las características siguientes: tamaño de la partícula = 20-30 μ ; agua recuperada por gramo de -

sephadex seco = 5.0 - 0.3 gr.; volumen del gel por gramo de sephadex seco = 10 ml.; orden de fraccionamiento = 30.000 á 1.500.

3.- Columnas de vidrio de 0.8 x 24 cm. (para este propósito tambien pueden servir las columnas montadas en pipetas serológicas de - 10 ml.).

(G-2c).- Preparación de las columnas

En un vaso de precipitados se ponen 2 gr. de sephadex G-50 fino y se añaden 50 ml. de agua destilada, mientras se agita con una varilla. Se deja en reposo de 5 á 6 horas a temperatura ambiente, se decanta parte del líquido sobrenadante, se agita bien y se empaqueta en la columna tomando las mismas precauciones que se expusieron en el apartado F-3.

La columna se deja en cámara fría a 4°C, equilibrando durante un día con tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6) más albúmina humana 0.25%. La altura final alcanzada por el gel en la columna es de 22 cm.

La columna, previamente calibrada para saber el punto en que eluye la insulina I^{I25}, se conecta al colector de fracciones automático, y se procede a la purificación de la hormona marcada.

(G-2d).- Procedimiento de purificación

Una vez terminado el marcaje de la insulina, la mezcla del marcaje se aplica a la columna de sephadex G-50 fino y se lava el vial

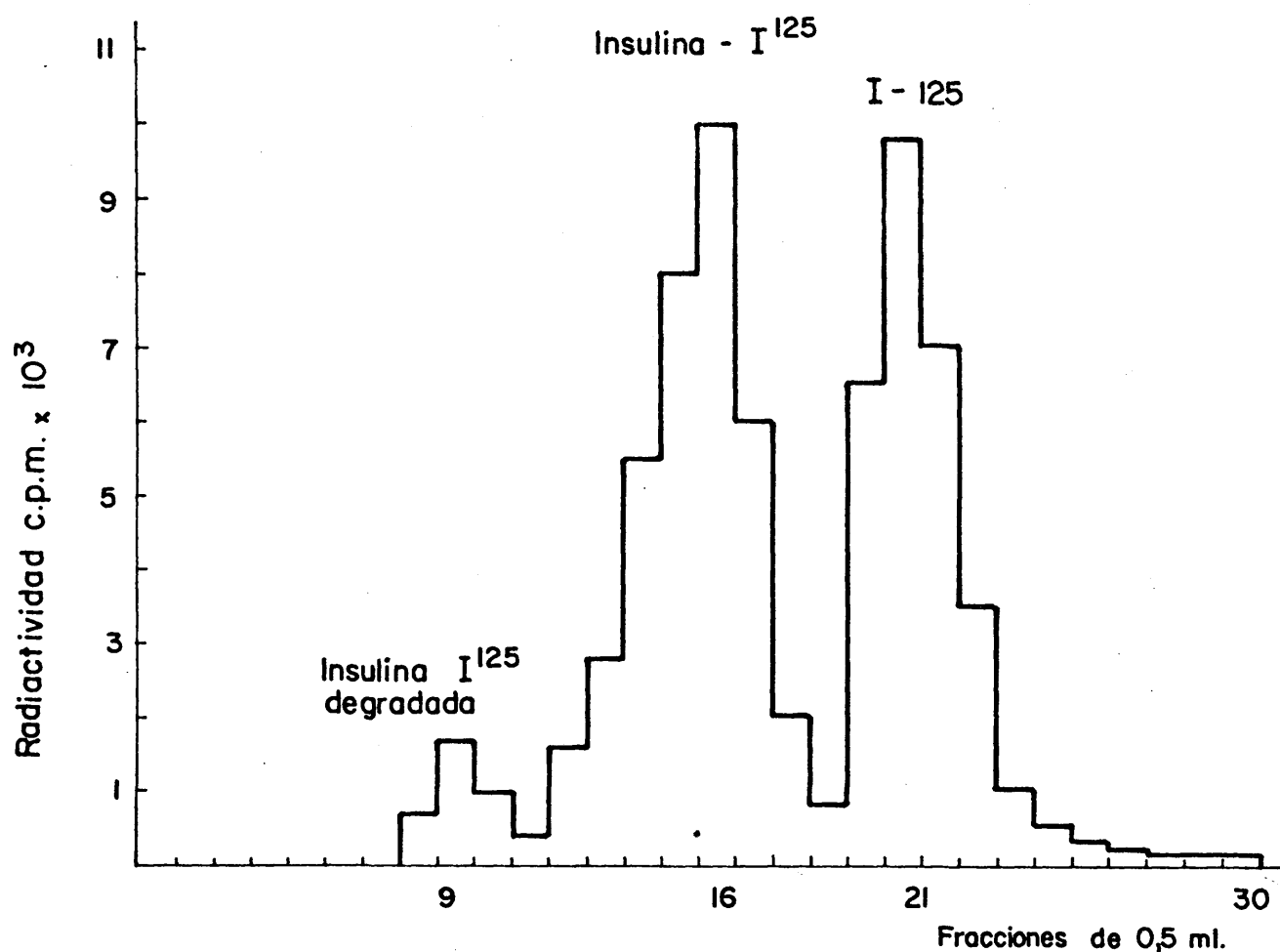


FIGURA 2.- Purificación de insulina- I^{125} por cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (0.8 x 22 cm).

La mezcla del marcaje de la insulina- I^{125} se filtra por la columna, colectándose fracciones de 0.5 ml. que se diluyen con tampon veronal sódico 0.05 M (pH 8.6) adicionado con albúmina humana 0.25 %. En una pequeña alícuota procedente de cada fracción se valora la radioactividad (cpm).

Fracciones 8 a 10.- Insulina- I^{125} degradada

Fracciones 12 a 18.- Insulina- I^{125} intacta

Fracciones 20 a 24.- Iodo 125 libre

con tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6) más albúmina humana 0.25%

Cuando la muestra a pasado al gel, la columna se eluye con tampón veronal más albúmina. Se toman fracciones de 0.5 ml. Con el volumen vacío aparecen productos degradados, la proteína intacta aparece después y en último termino eluye el yodo libre.

De cada una de las fracciones correspondientes al pico de la insulina I^{125} (que corresponden a las fracciones nº 13-18), así como de las fracciones que corresponden al pico del yodo I^{125} libre (nº 21-22), se toma una alícuota para determinar posteriormente el grado de pureza.

Cada fracción se diluye con tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6) más albúmina humana 0.25%. Se toma una alícuota para valorar su radioactividad (cpm), y poder calcular posteriormente la concentración de insulina I^{125} de las fracciones seleccionadas para el inmunoensayo.

La figura nº 2 muestra una curva de purificación de insulina I^{125} en sephadex G-50 fino.

Las fracciones mas puras se dividen en alícuotas y son guardadas en congelador a -20°C , para su uso posterior en el inmunoensayo.

(G-3).- Determinación del porcentaje de hormona marcada intacta y del grado de pureza de las fracciones.

(G-3a).- Consideraciones teóricas.

Se realiza por cromatoelectroforesis en papel Whatman 3 MM.

Por este procedimiento, la separación de la insulina I^{125} intacta - absorbida al papel en el punto de aplicación (origen), de los componentes degradados, desplazados junto con las seroproteínas (proteína) se realiza mediante un flujo hidrodinámico (37).

Sobre el aparato de electroforesis, cuya superficie permanece abierta, se colocan horizontalmente las tiras de papel. La evaporación da lugar a una concentración de las sales del tampón sobre la superficie de las tiras. Como consecuencia se produce un flujo del líquido desde las cubetas del aparato hacia el centro de las tiras de papel (flujo capilar aumentado por la fuerza osmótica).

Si se aplican las muestras en el extremo catódico (origen), el flujo hidrodinámico produce un movimiento de los solutos hacia el ánodo.

La electroforesis simultánea facilita la separación del I^{125} , - de las proteínas plasmáticas; al mismo tiempo que éstas se desplazan en bloque llevando con ellas la fracción dañada de la insulina marcada (proteínas).

(G-3b).- Materiales.

1.- Tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6), para la cromatoelectroforesis.

2.- Tiras de papel Whatman 3 MM.

A una distancia adecuada de uno de los extremos de las tiras de

papel, se marcan con lápiz dos líneas, el área localizada entre ellas sirve de guía para la aplicación de las muestras.

3.- Plasma normal de conejo.

4.- Azul de Bromofenol (British drug Houses).

5.- Equipo de electroforesis.

(G-3c).- Preparación de las muestras.

En tubos de 5 x 0.375 cm. previamente numerados, se pipetea una alícuota de la mezcla de marcaje, así como de las fracciones procedentes de la purificación de la hormona marcada, y correspondientes al pico de la insulina I^{125} (nº 12-16) y del I^{125} libre (nº 18 ó 21).

Se completa el volumen a 100 μ l con tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6).

Inmediatamente antes de la aplicación de las muestras a las tiras de papel, se añade a cada tubo una alícuota del plasma normal de conejo con azul de bromofenol. Esta solución actúa como "carrier" - indicador.

(G-3d).- Cromatoelectroforesis.

Las tiras de papel Whatman 3 MM se humedecen individualmente en el tampón veronal, y se colocan numeradas sobre el soporte del aparato de electroforesis. Ambos extremos de las tiras han de quedar sumergidos en el tampón veronal de las dos cubetas del aparato, y con el origen situado en el extremo del cátodo.

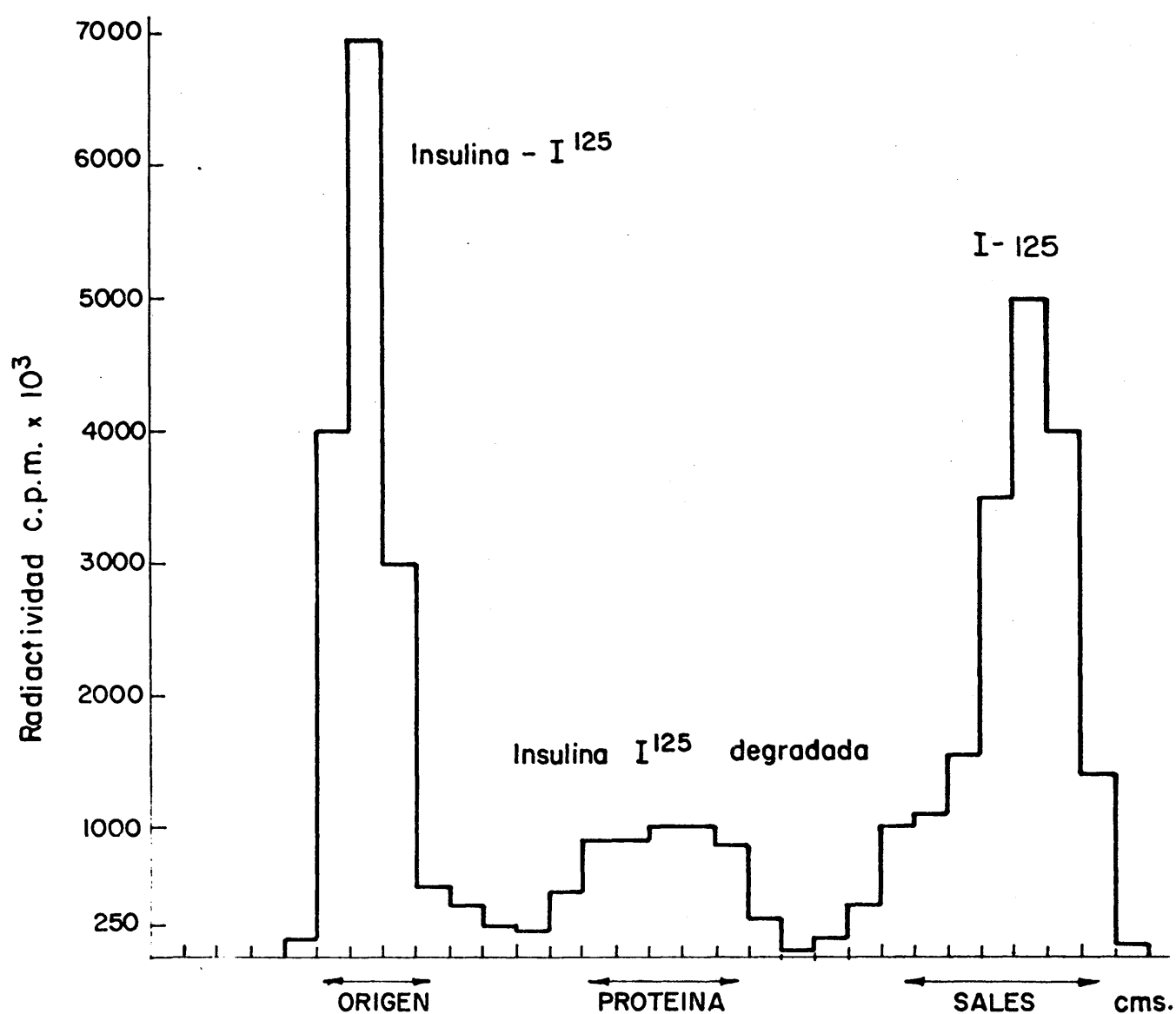


FIGURA 3.- Cromatoelectroforesis en papel Whatman 3MM de una alícuota de la mezcla del marcaje de la insulina- I^{125} .

En el origen se encuentra la insulina- I^{125} intacta.

Con las proteínas esta la fracción de insulina- I^{125} degradada

Con las sales aparece el Iodo I^{125} libre

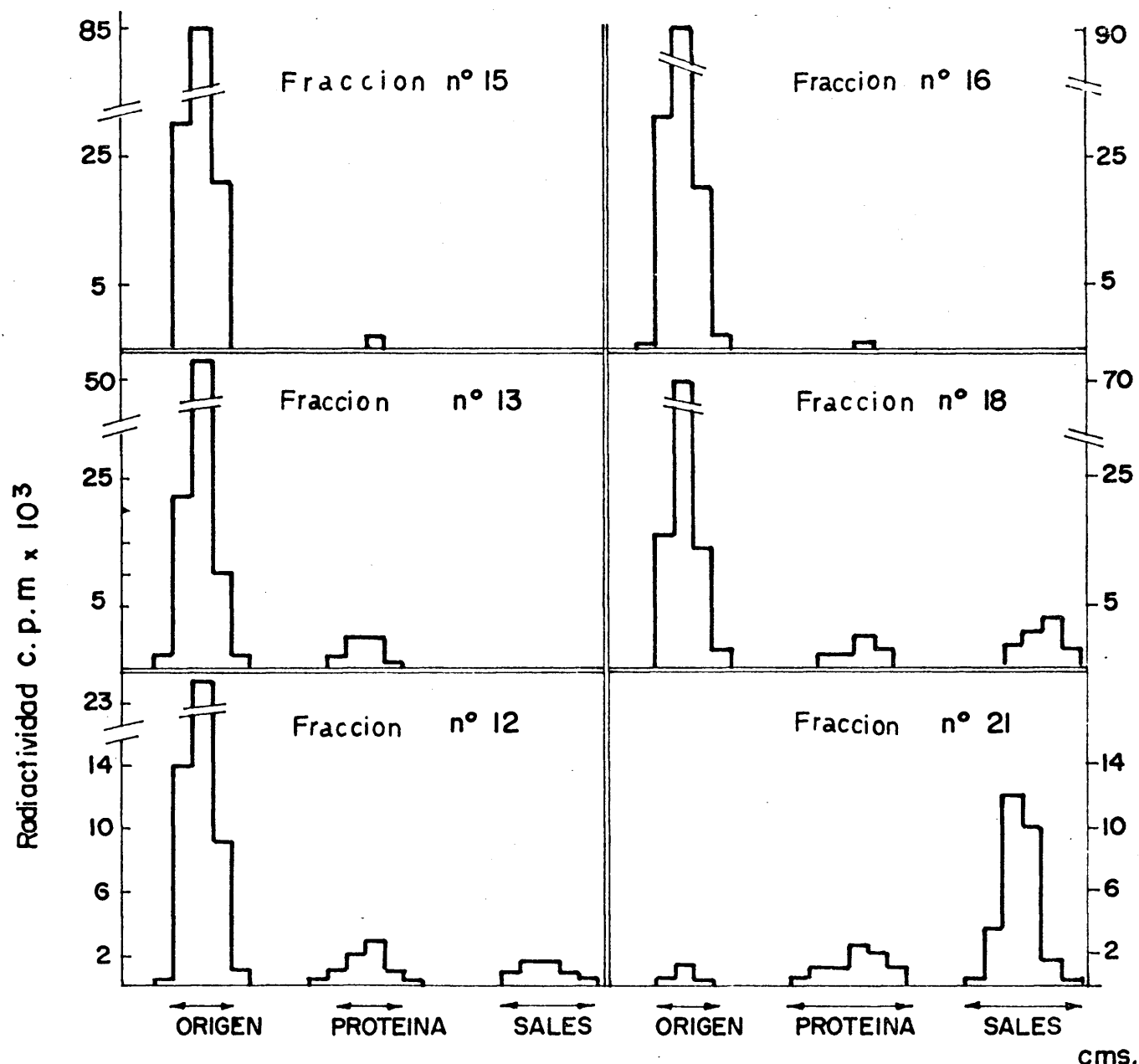


FIGURA 4.- Cromatoelectroforetogramas en papel Whatman 3 MM de alícuotas procedentes de las fracciones colectadas durante la purificación de la insulina-I¹²⁵ por una columna de sephadex G-50 fino (0.8 x 22 cm).

El origen representa la insulina-I¹²⁵ intacta, con las proteínas se encuentra la insulina-I¹²⁵ degradada y con las sales el Iodo¹²⁵ libre.

El mayor grado de pureza corresponde a las fracciones nº 15 y 16. El porcentaje de hormona degradada en estas fracciones es menor del 3 %.

La cromatoelectroforesis se realiza en cámara fría a 4°C, con sistema de aire circulante, que favorece la evaporación en la superficie de las tiras. Se emplea un voltaje constante de 25 voltios/ cm de longitud de las tiras, y 11 mAmpérios.

Después de 2 a 2.5 horas, la mancha azul indicadora de las proteínas plasmáticas se ha desplazado de 10 a 12 cm del origen.

Las tiras se secan a 120°C durante diez minutos, se cortan en cm y se lee su radioactividad en un contador Tricarb de radiación Gamma modelo 3002, calibrado para I^{125} .

La figura 3 muestra la distribución de la radioactividad en un cromatoelectroforetograma de una alícuota de la mezcla del marcaje. La radioactividad en el origen corresponde a la proteína intacta marcada (insulina- I^{125}); con las proteínas plasmáticas se encuentra la hormona degradada (insulina- I^{125} degradada). Y, por último, observamos el pico de radioactividad que corresponde al I^{125} libre (sales).

La figura 4 corresponde a las cromatoelectroforesis de alícuotas de las fracciones procedentes de la purificación de la insulina- I^{125} en columnas de sephadex G-50 fino.

Como puede verse, las fracciones más puras corresponden a los números 15 y 16. El porcentaje de insulina- I^{125} dañada, es siempre menor del 8 %.

(G-4).- Cálculos.

(G-4a).- Actividad específica de la insulina- I^{125} .

La actividad específica corresponde a la cantidad (mc) de I^{125} incorporada a un mg de la hormona.

Admitiendo que la hormona se marca en una proporción de un átomo de I^{125} / monómero de insulina (p.m. ≈ 6.000), aunque una fracción de la proteína puede contener dos ó mas átomos de iodo 125 , se puede calcular la actividad específica aproximadamente conociendo:

- 1) Actividad específica del lote de I^{125} que usamos.
- 2) Concentración de insulina cristalizada que empleamos en el marcaje
- 3) Cantidad de I^{125} que queda libre y no reacciona con la hormona

A partir de la cromatoelectroforesis de la mezcla del marcaje, podemos calcular fácilmente el % de I^{125} libre, se admite que tanto las fracciones de insulina- I^{125} intacta como la insulina- I^{125} degradada, tienen la misma actividad específica.

La actividad específica conseguida en nuestras preparaciones de insulina- I^{125} , ha sido siempre de ≈ 400 μ o/ μ g de proteína.

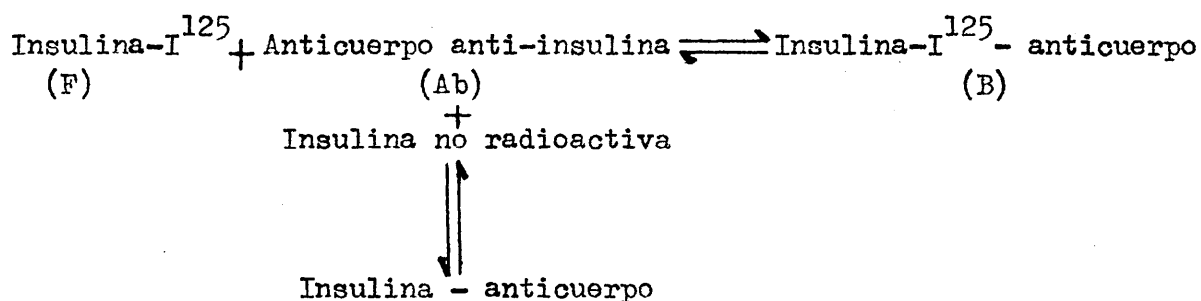
(G-4b).- Determinación del porcentaje de insulina- I^{125} intacta de las fracciones purificadas.

La pureza de las fracciones seleccionadas para el inmunoensayo, se determina a partir de las cromatoelectroforesis. El porcentaje de hormona intacta es del 91 al 94 %.

(G-5).- Radioinmunoensayo.

(G-5a).- Consideraciones teóricas.

El radioinmunoensayo está basado en una reacción entre la insulina radioactiva (insulina-I¹²⁵ ó insulina-I¹³¹) y el anticuerpo específico, dando lugar a la formación de un complejo "insulina radioactiva- anticuerpo"; y de la inhibición competitiva de esta reacción por la insulina no radioactiva.



Si en el sistema permanecen constantes la cantidad de insulina-I¹²⁵ y de anticuerpo, la razón B/F (complejo "insulina-I¹²⁵- anticuerpo/ insulina-I¹²⁵ libre), disminuye progresivamente al aumentar la concentración de insulina no radioactiva. De esta manera, empleando concentraciones crecientes y conocidas de insulina no radioactiva, podemos obtener una curva standard.

La concentración de insulina en soluciones no conocidas (muestras problema), se determina por comparación de su cociente B/F con la curva standard.

La sensibilidad y precisión de la técnica depende de la inclinación de la curva standard, determinada a su vez por la magnitud - en las variaciones del cociente B/F en relación con la variación de la concentración de insulina no radioactiva ($\Delta (B/F)/\Delta [\text{Insulina}]$), siendo por tanto requisitos necesarios: la obtención de insulina radioactiva de alta actividad específica, y el disponer de un anticuerpo de gran capacidad de reacción con el antígeno, aparte de una buena técnica de separación del complejo insulina radioactiva-anticuerpo, de la insulina radioactiva libre.

Características de la insulina radioactiva: De los estudios realizados sobre el comportamiento electroforético y cromatográfico de la insulina radioactiva, se ha obtenido una información muy útil para el desarrollo del inmunoensayo.

La insulina, en común con otras proteínas tiene la tendencia de ser absorbida por ciertas superficies inertes, como el papel y el vidrío. Aunque concentraciones relativamente bajas de otras proteínas tales como seroalbúmina (2.5 mg/ml) inhiben completamente la absorción de la insulina por el material de vidrio usado en el laboratorio, la inhibición de la absorción de la hormona por ciertos tipos de papel no se puede conseguir ni aun utilizando concentraciones - muy altas de albúmina.

Si se aplica a una tira de papel Whatman 3 MM ó 3 MC una mezcla

de insulina radioactiva y plasma control, la primera permanece fija da al sitio de aplicación (origen), mientras que las proteínas plasmáticas se desplazan a una distancia de este.

Si a las tiras de papel se les aplica previamente una concentración de insulina no radioactiva (100 $\mu\text{g/ml}$), hasta conseguir saturar los sitios del papel que absorben a la hormona, la insulina radioactiva aplicada posteriormente emigra cromatográfica y electroforéticamente.

En contraste, la insulina radioactiva unida al anticuerpo se desplaza a una zona situada entre las β y γ globulinas, aun en los papeles que no han sido previamente saturados con insulina.

Esta conducta de la insulina fué aprovechada primeramente por Yalow y Berson en su método original, con dos finalidades: 1.- Valorar la insulina radioactiva dañada, que se une y desplaza junto con las proteínas plasmáticas y 2.- Separar la insulina radioactiva libre del complejo insulina radioactiva-anticuerpo (37). En su método original estos autores consiguen ambos propósitos aplicando los procedimientos de electroforesis ó cromatoelectroforesis a temperatura de 4°C.

Nosotros, en nuestra técnica conseguimos los mismos fines aplicando una cromatografía simple en papel Whatman 3 MM y a temperatura ambiente.

No todos los tipos de papel sirven para estos propósitos. El -

más utilizado es el papel Whatman 3 MC ó 3 MM; y dentro de estos tipos, las características varían con los distintos lotes; por lo que es muy necesario hacer siempre unas pruebas en cada lote con el fin de buscar las condiciones mas favorables.

Por otra parte, ya que las seroproteínas también se absorben al papel, el empleo de suficiente globulina "carrier" para evitar el arrastre del complejo insulina radioactiva-anticuerpo a lo largo del trayecto de migración, es otra de las pruebas importantes que hay que realizar.

(G-5b).- Materiales:

I.- Diluyente standard.- Todos los componentes del inmunoensayo se preparan en tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6) conteniendo albúmina humana 0.25% y plasma normal de cobaya al 1%. La adición de estas proteínas evita la pérdida por absorción a la superficie del vidrio del antígeno y anticuerpo respectivamente. Ya que la concentración de sales puede influir en el desarrollo del inmunoensayo (37) el diluyente standard se filtró siempre por una columna de sephadex G-50 fino.

2.- Insulina I^{125} de bovino.- Se descongela una alícuota de la hormona purificada y guardada para el inmunoensayo.

Ya que la vida media de la insulina I^{125} es de dos meses, y durante el periodo de almacenamiento (-20°C) se produce un daño progre

sivo en la hormona, se concluyó por purificar la cantidad necesaria para cada radioinmunoensayo.

La dilución final de la insulina- I^{125} requerida en el inmunoensayo depende de la actividad específica, y por tanto difiere de un lote a otro. Normalmente hemos utilizado una concentración de aproximadamente 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$.

3.- Standard de insulina cristalizada de origen bovino.

El standard se prepara disolviendo 2 mg de la insulina cristalizada de bovino (Lilly. Lote PJ - 4609), (hemos utilizado siempre el mismo lote de insulina para los standard y el marcaje de la hormona) libre de glucagón, en 10 ml de agua acidificada (pH 2.5). Se divide en alícuotas de 0.1 ml (concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se guarda en múltiples viales a -20°C . El standard así preparado se usa durante seis meses. Inmediatamente antes de montar el inmunoensayo, se descongela un vial y se diluye la hormona con el tampon utilizado.

4.- Anticuerpo.

En todos nuestros estudios hemos utilizado antisueros de cobaya anti-insulina de cerdo, especialmente seleccionados para pruebas de inmunoensayo (Lote K 9223)

Los antisueros proceden de la casa Wellcome Research Laboratories envasados en viales, cada vial contiene un residuo liofilizado de 0.5 ml de suero a dilución 1/1000, en tampon fosfato (0.04 M pH 7.4),

conteniendo thiomertiolato (0.6 mM) y seroalbúmina de bovino (1%).

Los antisueros liofilizados se pueden guardar a 4°C por tiempo indefinido, determinado por el periodo de validez de cada lote expresado en el envase. Una vez disuelto el producto en el tampón utilizado en el inmunoensayo, el anticuerpo se puede guardar a -20°C dividido en alícuotas. No es conveniente descongelarlo mas de una vez.

La dilución final utilizada en el inmunoensayo varía según los lotes, y dentro de un mismo lote está en relación con la insulina^{I25} empleada. De esto se deduce, que siempre que se trabaje con insulina marcada nueva, ó bien con un lote nuevo de anticuerpos hay que realizar una prueba denominada: "Curva de binding del anticuerpo".

La concentración correcta será aquella que dé un cociente B/F comprendido entre 1 y 2, y en cuyo caso el anticuerpo se combina con un 60% á 70% de la insulina radioactiva.

La dilución citada en los envases es solamente una guía, y representa la concentración final de anticuerpo requerida para combinarse aproximadamente con un 60% de 100 μ g de insulina radioactiva en un volumen total de 0.9 ml.

La figura nº 5 muestra una típica curva de "binding" del anticuerpo, obtenida en las condiciones determinadas al pie de la gráfica.

La concentración del anticuerpo elegida en este caso fué la de 1/150.000, que corresponde a un cociente B/F de 1.5.

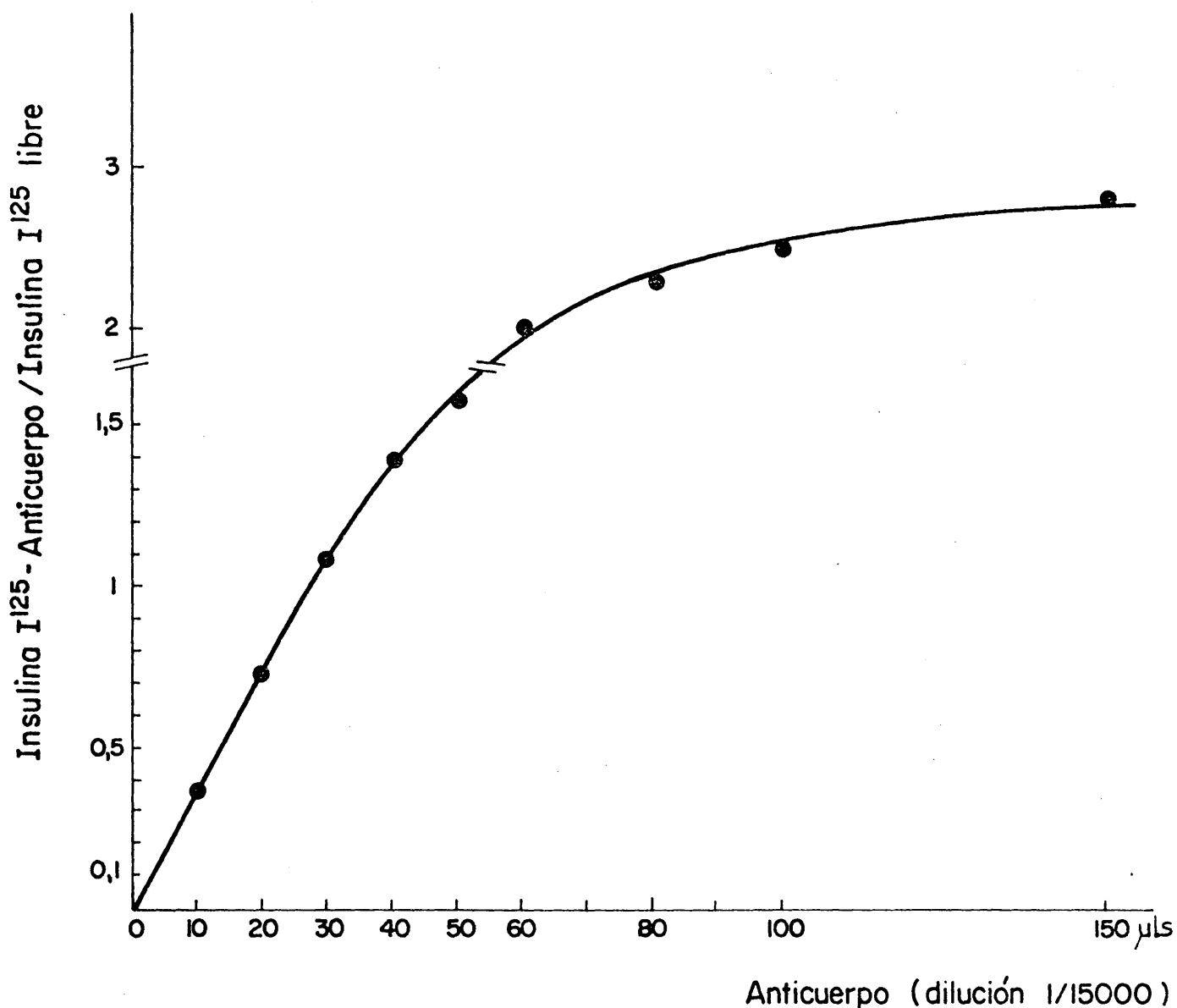


FIGURA 5.- "Curva de binding del anticuerpo anti-insulina"

Capacidad de combinación de concentraciones crecientes del antisuero específico anti-insulina de porcino (Lote K 9223) con una concentración fija ($\approx 100 \mu\text{g}$) de insulina- I^{125} .

La concentración de anticuerpo elegida corresponde a la que se combina con un 60 % de la insulina- I^{125} (cociente B/F de 1.5)

5.- Muestras problema.

En el estudio realizado en esta Tesis, hemos valorado siempre, todas y cada una de las fracciones procedentes de la cromatografía de los plasmas, y comprendidas entre la salida de la albúmina y las sales (nº 18 al 54); así como los plasmas no fraccionados, estos últimos a diluciones de 1/10 y 1/20.

En estas condiciones, es mínimo el daño producido por el plasma en la insulina-I¹²⁵, durante el periodo de incubación. Teniendo en cuenta que la insulina dañada no se combina con el anticuerpo, aun en estas condiciones en que trabajamos, en todos nuestros ensayos llevamos controles de " migración no específica" (MNE), que nos permiten trabajar en condiciones de gran pureza.

Los plasmas se descongelan inmediatamente antes del ensayo, se centrifugan a 2.000 rpm durante 15 minutos, y se valoran a las diluciones ya expresadas.

6.- Tubos para el inmunoensayo de 5 x 0.375 cm.

(G-5c).- Montaje del inmunoensayo.

I.- Protocolo tipo:

Para un volumen final de 500 μ l, se añaden con micropipeta los reactivos en el orden siguiente:

Nº	Tampón veronal+albúmina μ l	Insulina (2.5 μ g/ml) μ l	Concentración insulina (μ g) -----	Insulina ^{I25} (-100 μ g) μ l	Anticuerpo I/I5000 μ l
I	400	-----	-----	50	50
2	390	10	0.025	"	"
3	380	20	0.050	"	"
4	360	40	0.100	"	"
5	320	80	0.200	"	"
6	200	200	0.500	"	"
7	-----	400	1.000	"	"
* MNE	450	-----	-----	50	-----
MNE	450	-----	-----	"	-----

Fracciones
nº 18 al 54

Fracciones

		μ l 400	50	50
Plasma I/10		μ l 50	50	50
350				
Control plasma 400		50	50	-----
Plasma I/20		25	50	50
375				
Control plasma 425		25	50	-----

* MNE = Migración no específica ó control sin anticuerpo.

2.- Incubation.

Los tubos conteniendo las mezclas se dejan incubar durante 4 á 5 días. Es condición muy importante que esto se realice a 4°C.

(G-5d).- Cromatografía.

Materiales:

1.- Tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6) para la cromatografía.

2.- Tiras de papel Whatman 3 MM de 4 x 39 cm.

A 8 cm. aproximadamente de uno de los extremos de las tiras, se marcan dos líneas con lapiz, sirviendo de origen para la aplicación de las muestras.

3.- Plasma normal de conejo.

4.- Azul de bromofenol.

5.- Cubetas de cromatografía. (Iagoplast S.A. Madrid, según diseño nuestro). Se trata de recipientes de plástico de 65 cm. de largo x 5 cm. de alto y 3 cm. de ancho, en los que se introduce un extremo de las tiras (origen), una de las paredes, más elevada (7 cm.) sirve de soporte a estas.

A 29 cm. de distancia, un soporte longitudinal paralelo a la cubeta y de la misma altura que el soporte de esta, sirve de apoyo al extremo distal de las tiras.

Las cubetas acomodan bien hasta 15 tiras de 4 cm. de ancho.

Una tapa de cristal impide la rápida evaporación en la superficie

de las tiras y permite en todo momento observar la marcha de la cro
matografía.

Preparación de las tiras de cromatografía:

En las cubetas de cromatografía conteniendo tampón veronal sódico, se humedecen individualmente las tiras, y se colocan horizontalmente entre los dos soportes de las cubetas. El extremo del origen ha de quedar completamente sumergido en el tampón veronal.

Preparación y aplicación de las muestras:

- I.- Inmediatamente antes de la aplicación, se sacan del refrigerador un nº suficiente de muestras para llenar una cubeta. Se les añ
de una alícuota de plasma normal de conejo con azul de bromofenol.
(Esta solución sirve de guía visual para determinar la migración máxima del complejo antígeno-anticuerpo, durante la cromatografía.)
Se mezclan bien y se procede a su aplicación.
- 2.- En el origen de cada tira, se aplica un volumen total de 250 μ l de la muestra. (Para evitar el arrastre, esta aplicación se rea
liza en tres fases: 100-100 y 50 μ l respectivamente).
- 3.- En un tiempo aproximado de 2 á 3 horas, la separación de la man
cha azul (indicadora de las proteínas) desde el origen, es máxima.
- 4.- Las tiras se colocan en soportes adecuados y se secan en estufa a 120°C durante 10 minutos.
- 5.- La preparación de las tiras para valorar su radioactividad se rea

liza de la manera siguiente: se superponen las áreas del origen y la proteína y se corta la tira por la mitad, al mismo tiempo que se desechan los dos extremos. Cada sección se enrolla con la porción radioactiva situada en el interior, y se introducen en tubos especiales. La radioactividad se lee en un contador Tricarb de radiación Gamma (modelo 3002) calibrado para I^{125} .

(G-5e).- Cálculos:

- 1.- Obtener en cada tira las cpm que corresponden al origen y a la proteína. Determinar las cuentas totales que corresponden a cada tira.
- 2.- Corregir en cada tira la insulina I^{125} dañada, que emigra con las proteínas. Esta corrección se hace determinando las cuentas que corresponden a la insulina I^{125} útil para combinarse con el anticuerpo.

Calcular % de MNE de las tiras control y restarlo de 100. Este valor representa el % de insulina I^{125} útil para unirse al anticuerpo.
- 3.- Determinar el % de insulina I^{125} libre (F).
- 4.- Determinar el % de insulina I^{125} unida al anticuerpo (B).
- 5.- Determinar el cociente B/F.
- 6.- Representar la curva dosis/respuesta, utilizando el cociente B/F y las concentraciones standard de insulina no marcada.

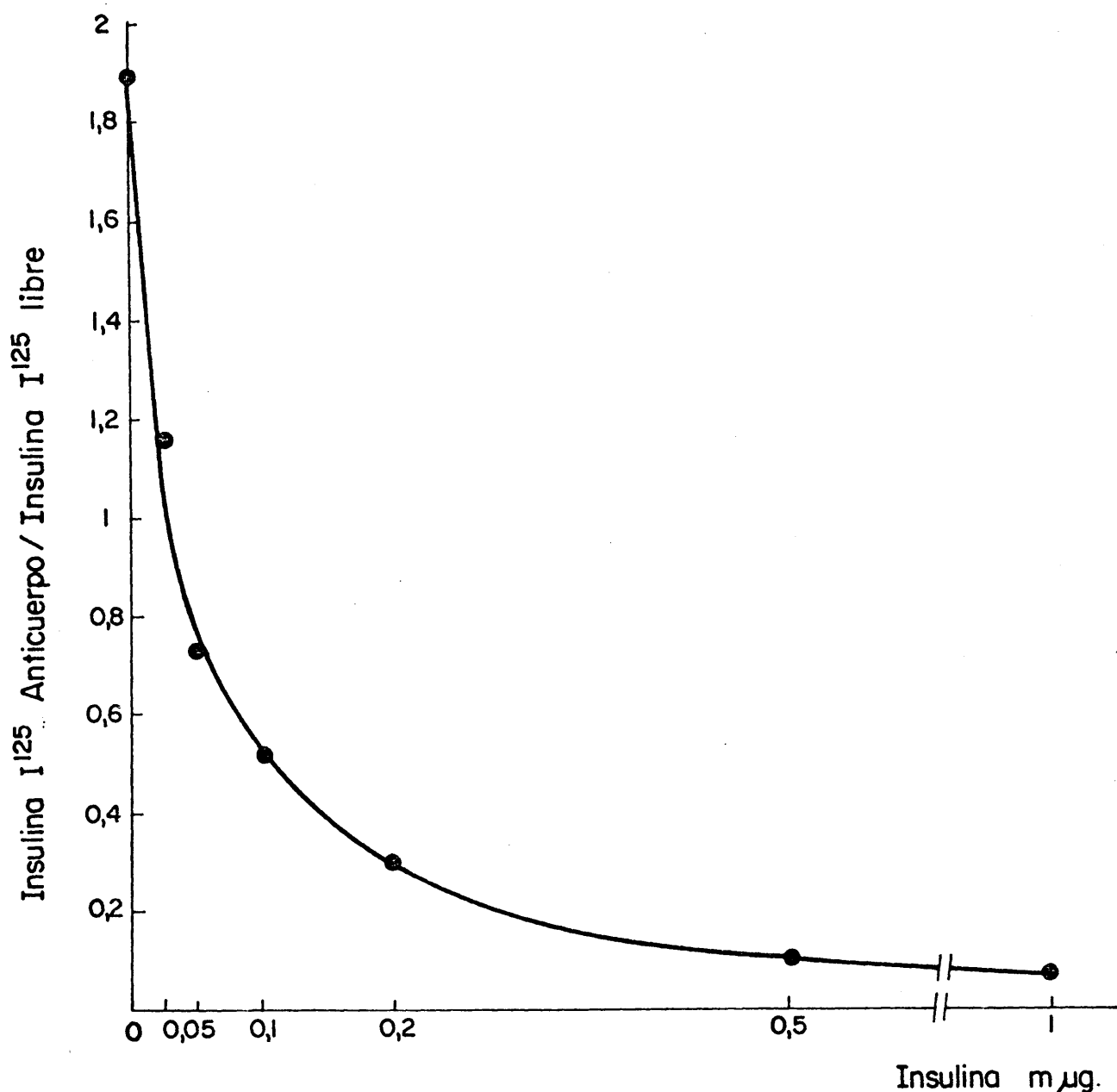


FIGURA 6.- Curva standard

Representación gráfica de cocientes B/F (insulina-I¹²⁵ anticuerpo/ insulina-I¹²⁵ libre) en función de concentraciones crecientes de insulina no radioactiva.

Para una concentración fija de la insulina-I¹²⁵ ($\approx 100 \mu\mu\text{g}$) y del antisuero anti-insulina (dilucion 1/ 150.000), la presencia de concentraciones crecientes desde 0 a 1 mμg de la insulina no radioactiva, produce una caída del cociente B/F que está en razon directa a las concentraciones de insulina no radioactiva presentes.

7.- Determinar en cada muestra valorada la concentración en μg por el volumen ensayado, y calcular $\mu\text{g}/\text{ml}$ ó $\mu\text{U}/\text{ml}$.

La figura 6 representa una curva standard obtenida en las condiciones expuestas al pie de gráfica. Puede observarse que la caída más importante del cociente B/F se produce entre las concentraciones de 0 y 0.5 μg de la insulina no radioactiva.

H.- AISLAMIENTO DE LOS COMPONENTES "BIG INSULINA", "LITTLE INSULINA"
Y "MINI INSULINA".-

Hemos seguido basicamente el procedimiento de Roth y col. (108).

(H-1). Materiales.

- 1.- Sephadex G-50 fino
- 2.- Columnas de vidrio de 4 x 60 cm
- 3.- Tampon veronal sódico 0.05 M (pH 8.6), conteniendo albúmina humana 0.25 %.

(H-2). La preparación del gel, el empaquetamiento y equilibrio de las columnas se realizaron siguiendo las pautas expuestas en los apartados F-3 y F-4.

(H-3). Calibración de las columnas.

La altura alcanzada por el gel, una vez equilibrada la columna fué de 54 cm.

Cuarenta ml de plasma normal de conejo incubados durante unas horas a 4°C con insulina-I¹²⁵, se aplicaron a la columna. Una vez que el plasma ha penetrado totalmente en el gel, la columna se eluye con el tampon veronal sódico 0.05 M (pH 8.6) adicionado con albúmina humana 0.25 %. El procedimiento se realiza en cámara fría a 4°C. El flujo de elución es constante y se realiza a 10 ml/ hora. Se colectan fracciones de 4 ml y se valoran por D.O. a 275 mμ de longitud de onda, y por radioactividad.

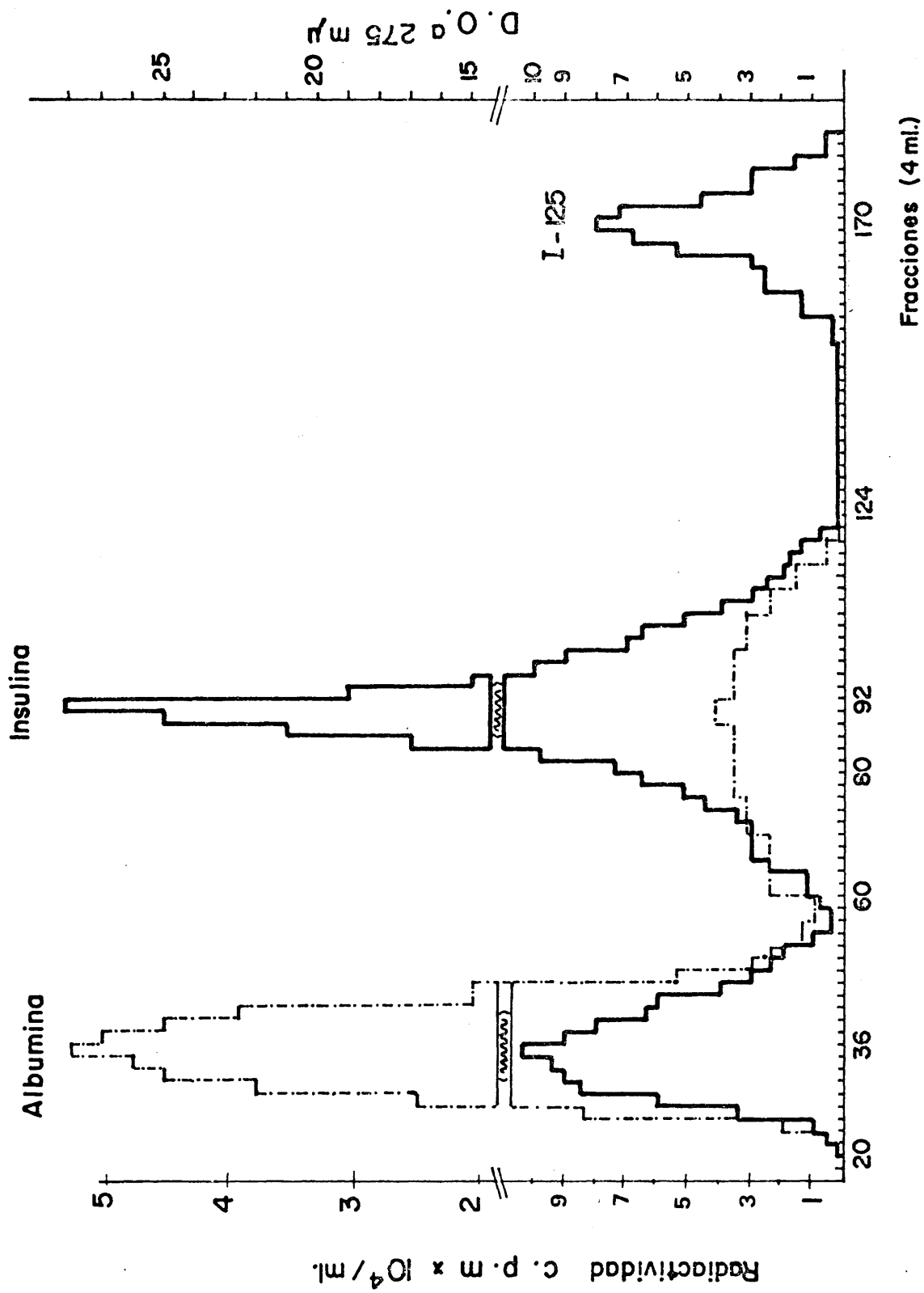


FIGURA 7.

La figura 7 representa la calibración de una columna de sephadex G-50 fino (4 x 54 cm). Observamos los volúmenes de elución de las proteínas plasmáticas de alto peso molecular (albúmina), de la insulina- I^{125} y del I^{125} libre.

RESULTADOS

Grupo I.- COMPONENTES INSULINO-IMUNORREACTIVOS EN EL PLASMA DE CONEJOS EN AYUNO DE 24 HORAS (Grupo control).

Exponemos a continuación los resultados obtenidos en el estudio realizado en los animales en condiciones basales. Cinco horas después de la intervención quirúrgica, con los conejos completamente recuperados se tomaron las muestras de sangre portal heparinizada, valorando en cada uno de los plasmas la concentración total de insulina y glucosa.

Para el estudio de los componentes insulino-inmunorreactivos, teniendo en cuenta las bajas concentraciones de insulina circulante, así como el efecto de dilución que se produce durante el fraccionamiento proteico de los plasmas, los volúmenes filtrados por la columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm), fueron siempre de dos ml.

En la tabla I se reflejan los valores individuales de las glucemias e insulinemias. Los resultados se expresan para la glucosa en mg % ml de plasma, y para la insulina en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma.

De los distintos componentes insulínicos, damos su concentración expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma, así como sus porcentajes respectivos.

Así mismo se da el porcentaje de insulina recuperada en el fraccionamiento proteico de los plasmas.

El promedio de valores encontrado fué, de 156 mg de glucosa % ml de plasma (± 28) para las glucemias, y de 1.238 μg de insulina cir-

culante/ ml de plasma (± 0.16).

El porcentaje de insulina recuperada en las cromatografías fué siempre del 90 al 97 %.

En la figura 8 (consideraciones técnicas al pié de gráfica) representamos un experimento tipo. Por el distinto volumen de elución en la columna de cromatografía, se observa claramente la existencia de tres fracciones ó componentes insulínicos, que reaccionan con los antisueros específicos anti-insulina.

La fracción mayor aparece como un pico simétrico, en una zona intermedia entre los picos de elución de las proteínas de alto peso molecular (albúmina) y las sales plasmáticas; correspondiendo por tanto, a la región en que eluye la insulina- I^{125} en la calibración de las columnas (fig I página 64).

Una segunda fracción aparece como un pequeño pico de material inmunorreactivo, situado en una zona anterior a la insulina- I^{125} , entre esta y el pico de las seroproteínas. Por su posición cromatográfica, este material corresponde a un peso molecular mayor que el de la insulina cristalizada.

Ambos componentes presentan características cromatográficas similares a los descritos por Roth y col (108) en el hombre, con la denominación de "little insulina" y "big insulina", respectivamente.

Por último, nosotros encontramos consistentemente un tercer com-

ponente ó fracción, que por ser más retenido por el sephadex, aparece como un pequeño pico de material inmunorreactivo situado en una región posterior a la "little insulina", entre esta y el pico de las sales plasmáticas. Este componente, descrito por primera vez en esta Tesis Doctoral, por las características cromatográficas que presenta, ha sido denominado tentativamente "mini insulina".

En condiciones basales, los valores porcentuales de los tres componentes circulantes en la sangre portal fueron los siguientes:

"big insulina" - 2 al 11 % , "little insulina" - 86 al 94 % y "mini insulina" - 2 al 4 % de la insulina total circulante.

Ante estos resultados, podemos señalar que en los animales de nuestro grupo control, la concentración total de insulina inmunorreactiva circulante en la sangre portal, corresponde a los valores normales comunicados por otros laboratorios.

Por otra parte, si bien las concentraciones de glucosa corresponden al límite superior de los niveles considerados como normoglucémicos, cabe pensar que este hecho no se deba a la acción aguda del stress quirúrgico, pues aparte de realizar los experimentos en animales completamente recuperados, el empleo previo de la dehidroergotamina, evita el efecto hiperglucémico de la anestesia con eter. Según esto, sugerimos la posibilidad, de que los niveles glucémicos relativamente altos, puedan ser debidos a que nuestras determinaciones están reali-

zadas en el plasma, y sabemos que en estas condiciones la concentración de glucosa es un 15 ó 20 % más elevada que cuando se determina en la sangre total (170).

Es de gran interés señalar, la presencia en el plasma de tres componentes insulino-inmunorreactivos ("big insulina" , "little insulina" y " mini insulina"), si bien la mayor parte de la hormona circulante corresponde a "little insulina".

Control de reacción inmunológica de la posible existencia en el plasma de otros factores diferentes de la insulina, que puedan interferir en el radioinmunoensayo.

Los resultados que hemos obtenido al estudiar las características cromatográficas de la insulina inmunorreactiva circulante en la sangre portal de conejos en condiciones basales, han demostrado de una manera consistente, la presencia de los tres componentes ya descritos.

Sin embargo existía la duda de que estos resultados pudieran ser debidos a un artefacto de nuestro sistema experimental.

Realizamos pues, un doble control radioinmunológico, que nos sirvió para excluir la posibilidad de que otros factores diferentes de la insulina y presentes en el plasma, pudieran ser en el inmunoensayo la causa de alteraciones del cociente B/F (insulina- I^{125} unida al anticuerpo/ insulina- I^{125} libre), y dar lugar a falsos resultados.

Para ello, y siguiendo la sistemática general, dos ml de plasma procedente de un conejo en ayuno de 24 horas se filtraron de la manera habitual por una columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm), colectando fracciones de 1 ml. La valoración radioinmunológica de todas y cada una de las fracciones comprendidas entre los puntos de elución de la albúmina y las sales, se acompañó de dos controles, uno de MNE (en ausencia de anticuerpo) y otro con un exceso de anticuerpo.

El control de MNE (migración no específica) fué del mismo orden en todas las fracciones, y por otra parte, coincidió con los valores encontrados normalmente en todos nuestros ensayos, (aproximadamente un 6 a 7 %).

Por su parte, en el control de exceso de anticuerpo, aproximadamente un 93 % de la insulina-I¹²⁵ se unió al anticuerpo.

Ambos controles nos indicaron, como en el radioinmunoensayo, la insulina-I¹²⁵ está inmunologicamente intacta (no degradada), y que no existen otras sustancias que interfieran con el antisuero específico anti-insulina.

Tabla I – Concentración de glucosa, insulina total y componentes

IRI* circulantes en el plasma portal de conejos

(Grupo control: ayuno de 24 horas).

Animales grupo I	Glucosa en plasma (mg %ml)	Insulina en plasma (m μ g/ml)	Componentes insulino - inmunoreactivos (IRI*)						Insulina recuperada	
			"BIG " Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina			
			Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración (m μ g / 2 ml)	%
1	150	1,075	0,0268	2,5	1,005	93,50	0,043	4,0	2,00	93
2	180	1,250	0,050	4,0	1,155	92,40	0,044	3,55	2,25	90
3	123	1,390	0,052	3,8	1,311	94,36	0,030	2,2	2,62	94
4	180	1,075	0,094	8,75	0,946	88,00	0,034	3,25	2,00	93
5	138	1,400	0,152	10,9	1,209	86,40	0,035	2,56	2,72	97
Media	156	1,238		5,99		90,93		3,11		
D.E \pm	± 28	$\pm 0,16$		$\pm 3,63$		$\pm 3,52$		$\pm 0,73$		

* Componentes IRI = Componentes insulino – inmunoreactivos

** La concentración de los componentes IRI se da en relación a la Insulina total circulante / ml de plasma

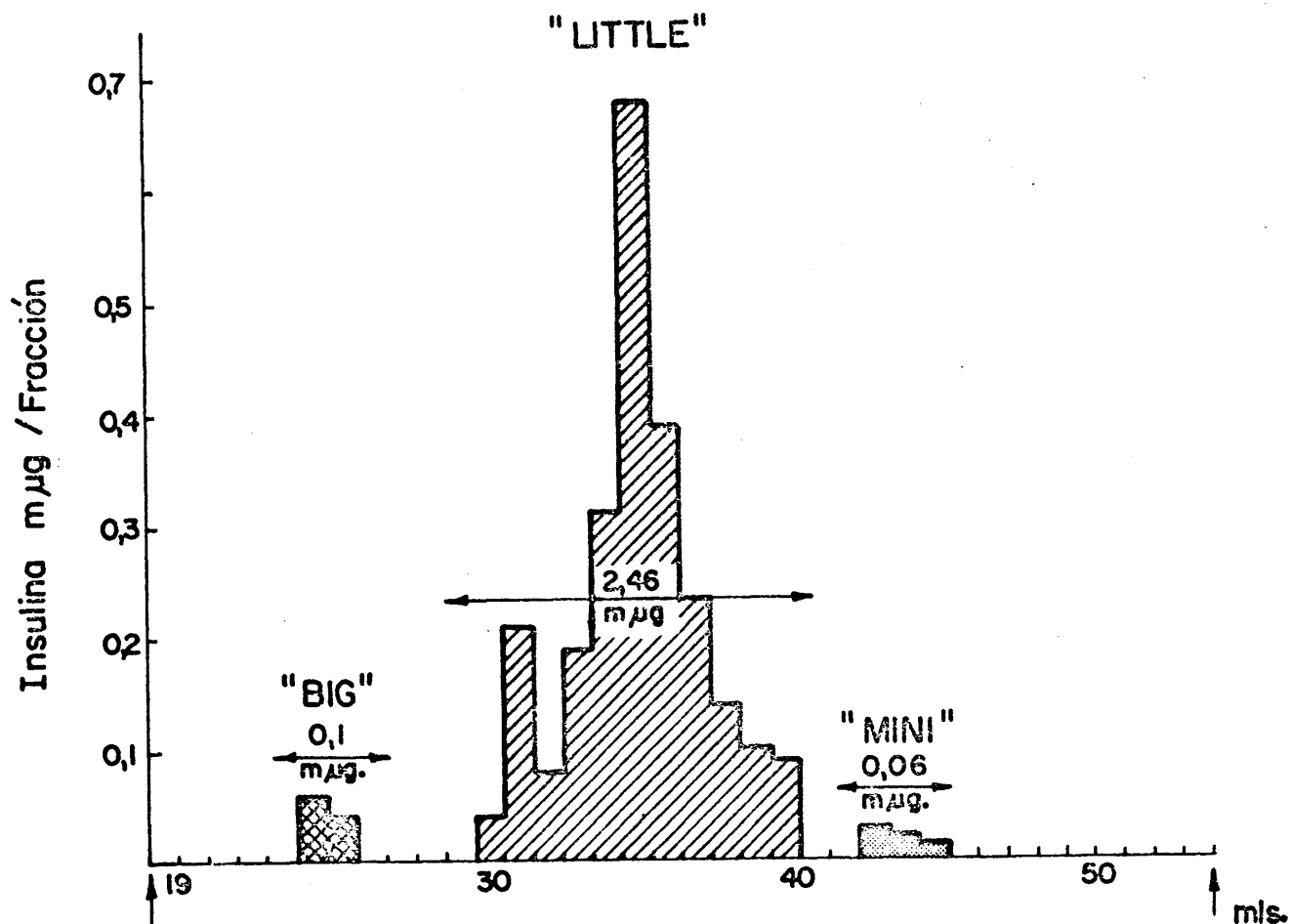





FIGURA 8.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de dos ml de plasma (sangre de la vena porta, conejo en ayuno de 24 horas).

En ordenadas se expresan los mμg de material inmunorreactivo recuperado/ fracción.

En abscisas representamos el número de fracciones. Las flechas a derecha e izquierda representan la localización de la albúmina y las sales, respectivamente. Las cifras anotadas en los picos representan la cantidad total de material inmunorreactivo recuperado en las correspondientes fracciones.

-  El material inmunorreactivo localizado aproximadamente entre el pico de la albúmina y la insulina-Il25.
-  El material inmunorreactivo localizado aproximadamente a la mitad de distancia entre los picos de la albúmina y las sales.
-  Corresponde al material inmunorreactivo localizado entre la insulina-Il25 y las sales plasmáticas.

Grupo II.- COMPONENTES INSULINO-IMUNORREACTIVOS EN EL PLASMA, COMO
RESPUESTA AL AYUNO PROLONGADO.

Este segundo grupo de nuestro planteamiento experimental, comprende el estudio de los componentes insulino- inmunorreactivos circulantes en sangre portal de conejos sometidos a un ayuno prolongado (48 horas), sin estímulo. Las muestras de sangre portal heparinizada se tomaron cinco horas después de finalizada la intervención quirúrgica, con los animales recuperados totalmente.

Valoramos en cada uno de los animales, la concentración de glucosa y de insulina inmunorreactiva total, circulante en la sangre.

Tratando de encontrar condiciones más adecuadas para valorar los componentes insulínicos en estos plasmas, fué necesario hacer una adaptación de las condiciones técnicas, consistente en: a) Filtrar volúmenes de tres ml de plasma por la columna de sephadex G- 50 fino (1 x 50 cm). b) Aumentar el volumen de la muestra valorada en el radioinmunoensayo hasta 480 μ l. Con estas modificaciones logramos que el método tuviese sensibilidad suficiente, para poder valorar las muy bajas concentraciones a que se encuentran dichos componentes en estos plasmas.

En la tabla II se resumen los valores individuales de las glucemias (en mg de glucosa % ml de plasma), la concentración total de insulina circulante (en μ g/ ml de plasma), y los componentes insulino-

inmunorreactivos expresados tanto en su concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma) como su porcentaje respectivo.

Tambien se dan los porcentajes de hormona recuperada durante el fraccionamiento proteico.

Los valores medios encontrados en este grupo de animales corresponden a $0.75 \mu\text{g}$ de insulina/ ml de plasma (± 0.096); y de 111.8 mg de glucosa $\%$ ml de plasma (± 11.92)

El porcentaje de insulina recuperada en las cromatografias fué siempre, de 90 a 92 $\%$ de la hormona total detectada en los plasmas no fraccionados.

En la figura 9 representamos un experimento tipo. Tambien aquí, la cromatografia del plasma de estos animales en ayuno de 48 horas, nos muestra la existencia de las tres fracciones ó componentes insulino- inmunorreactivos, cuyos porcentajes corresponden a los valores siguientes: " big insulina" - 2 al 9 $\%$, "little insulina" - 88 al 98 $\%$ y "mini insulina" - 0 al 4 $\%$ de la hormona circulante.

Podemos pues resumir el estudio de este grupo experimental señalando que: 1) Existe una disminución de la concentración total de insulina circulante en sangre de la vena porta, que es estadísticamente significativa ($p < 0.001$) al compararla con el grupo control. 2) Esta disminución en los niveles de insulina, se acompaña de una disminución que tambien es estadísticamente significativa ($p < 0.01$) de los

valores glucémicos.3) El porcentaje de los componentes insulino- inmunorreactivos es análogo al obtenido en los animales control, no siendo sus diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.5$). 4) En estas condiciones experimentales, la mayor parte de la hormona circulante corresponde a "little insulina".

Tabla II - Efectos del ayuno prolongado (48 horas) sobre la concentración de insulina, glucosa y componentes IRI* circulantes en el plasma portal de conejos.

Animales grupo II	Glucosa en plasma (mg %ml)	Insulina en plasma (m μ g/ml)	Componentes insulino - inmunoreactivos (IRI*)						Insulina recuperada	
			"BIG" Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina			
			Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración (m μ g/3 ml)	%
1	106	0,608	0,0121	2,0	0,595	98,0	—	—	1,68	92
2	98	0,703	0,0379	5,4	0,636	90,6	0,0281	4,0	1,90	90
3	115	0,840	0,0420	5	0,781	93,0	0,0168	2,0	2,28	90
4	130	0,830	0,0522	6,3	0,759	91,5	0,0182	2,2	2,28	91
5	110	0,770	0,0693	9,0	0,676	87,9	0,0238	3,1	2,10	90
Media	111,8	0,75	5,54		92,2		2,26			
DE \pm	$\pm 11,92$	$\pm 0,096$	$\pm 2,52$		$\pm 3,74$		$\pm 1,49$			

* Componentes IRI = Componentes insulínicos - inmunoreactivos

** La concentración de los componentes IRI se da en relación a la insulina total circulante /ml de plasma.

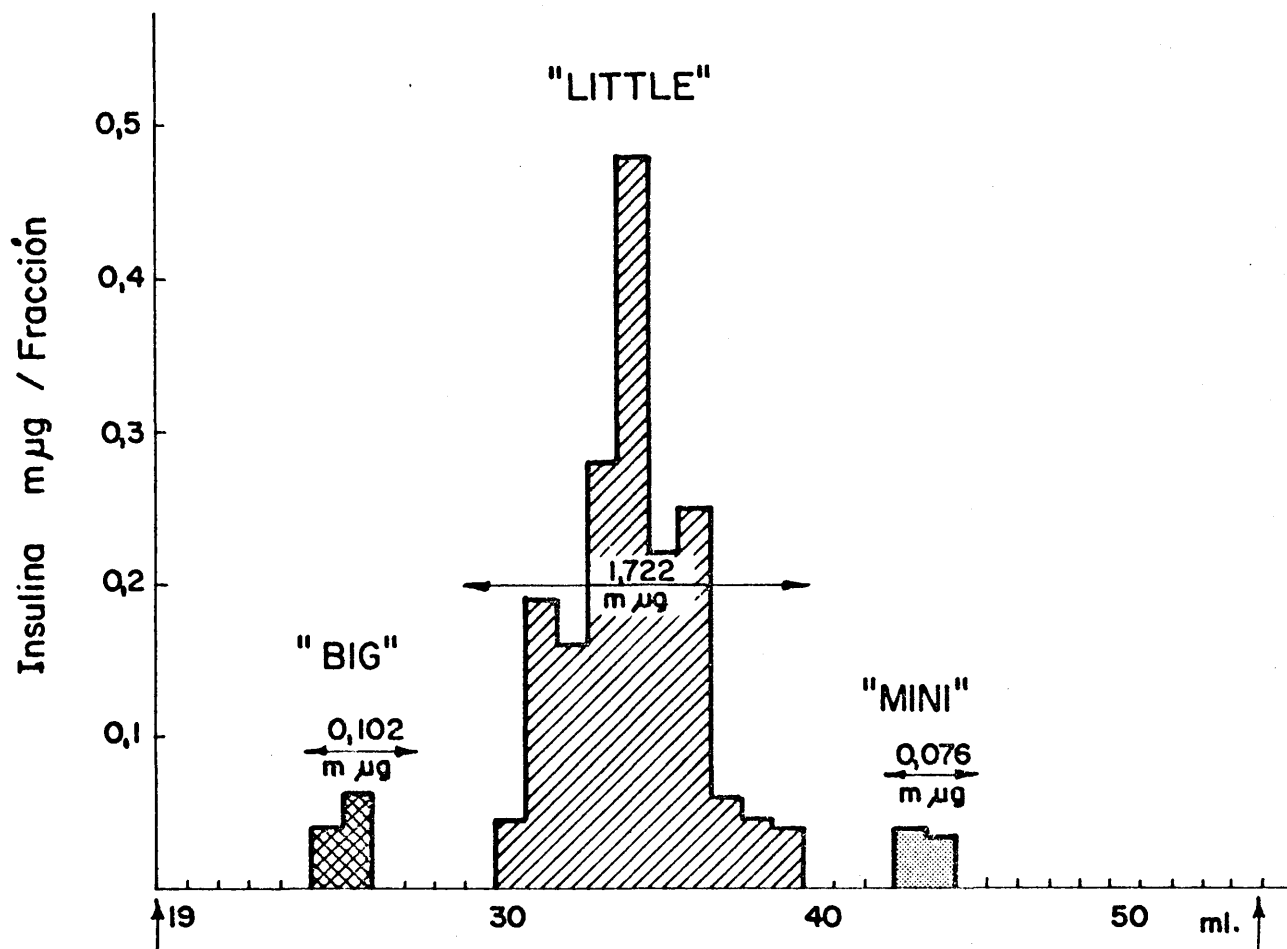


FIGURA 9.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de tres ml de plasma (sangre de la vena porta, conejo en ayuno de 48 horas).

En ordenadas se expresan los $m\mu g$ de material inmunorreactivos recuperado/ fracción.

En abscisas representamos el número de fracciones. Las flechas a derecha e izquierda representan la localización de la albúmina y sales, respectivamente. Las cifras anotadas en los picos representan la cantidad total de material inmunorreactivo recuperado en las correspondientes fracciones.

Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente entre el pico de la albúmina y la insulina-Il25

Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente a la mitad de distancia entre los picos de la albúmina y las sales.

Corresponde al material inmunorreactivo localizado entre la insulina-Il25 y las sales plasmáticas.

Grupo III.- COMPONENTES INSULINO-IMUNORREACTIVOS EN EL PLASMA, COMO
RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE GLUCAGON

Realizamos este grupo experimental estudiando conejos sometidos a un ayuno previo de 24 horas, y estimulados con glucagon intravenoso (100 μ g/ kg de peso). Las muestras de sangre portal heparinizada se tomaron cinco minutos despues de aplicado el estímulo, coincidiendo con el pico de máxima secreción de insulina (171). Como en todos los grupos experimentales, valoramos concentración de glucosa e insulina total del plasma.

Debido a las altas concentraciones de insulina circulante en este grupo de animales, el fraccionamiento proteico de los plasmas lo realizamos filtrando por la columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) volúmenes de 1 ml.

En la tabla III se muestra el resumen de los valores individuales de las concentraciones de glucosa expresada en mg % ml de plasma, de insulina total expresada en μ g/ ml de plasma y, asi mismo exponemos las concentraciones (μ g/ ml de plasma) y porcentajes respectivos de los componentes insulino-inmunorreactivos. Por último, damos los porcentajes de insulina recuperada en las cromatografias de los plasmas.

Puede comprobarse, en primer lugar una elevación altamente significativa ($p < 0.001$) en la concentración de insulina total, cuyo promedio corresponde a 12.28 μ g/ ml de plasma (± 4.33). Estos resulta-

dos están totalmente de acuerdo con el concepto reiteradamente confirmado, y que corresponden a la acción del glucagón como potente estimulante de la secreción de insulina (171)

Los valores encontrados en las glucemias son similares a los obtenidos en los animales del grupo control (p estadísticamente no significativa >0.5), cuyo promedio es de 159.66 mg de glucosa % ml de plasma (± 17.74). Estos resultados confirman también a este nivel, los obtenidos por Samols y col. (171), aportando una mayor consistencia al hecho, de que la secreción de insulina producida por el glucagón precede a las modificaciones de la glucemia.

El estudio de los componentes insulino-inmunorreactivos en estos plasmas queda graficamente expresado en la tabla III y figura 10, donde exponemos el apropiado experimento tipo.

En cuanto a dichos componentes IRI ("big insulina", "little insulina" y "mini insulina"), en esta especial situación experimental, nuestros resultados aportan las características siguientes:

Si bien la concentración de los tres componentes está considerada en su totalidad muy aumentada, la proporcionalidad en que se encuentran guarda la misma relación que en el grupo de los animales controles, no mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.5$), siendo sus porcentajes como sigue:

"big insulina" - 7 al 10 %, "little insulina" - 88 al 93 % y "mini in-

ulina" - 0 al 4 % de la insulina total circulante

Es evidente que de acuerdo con estos resultados: 1) El glucagón es un potente estímulo de la secreción de insulina. 2) Esta estimulación es anterior a los cambios glucémicos. 3) La mayor parte de la insulina circulante en estas condiciones experimentales corresponde a "little insulina", aunque la concentración de los tres componentes está proporcionalmente elevada.

Tabla III - Efecto del glucagón i.v. (100 µg / Kg de peso) sobre la concentración de Insulina, glucosa y componentes IRI* circulantes en el plasma portal de conejos en ayuno de 24 horas

Animales Grupo III	Glucosa en plasma (m g %ml)	Insulina en plasma (m µg/ml)	Componentes insulino - inmunoreactivos (IRI*)						Insulina recuperada	
			"BIG" Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina			
			Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración (m µg/ml.)	%
1	150,15	15,36	1,075	7,0	14,284	93,0	0,00	—	15,182	98,84
2	188,37	5,20	0,390	7,5	4,633	89,1	0,176	3,40	5,092	97,92
3	141,00	15,00	1,470	9,8	13,200	88,0	0,480	3,20	14,550	96,66
4	160,00	11,00	0,880	8,0	9,812	89,2	0,308	2,80	10,890	99,00
5	158,78	14,85	1,051	7,08	13,387	90,15	0,406	2,74	14,548	97,96
Media	159,66	12,28	7,87		89,89		2,42			
D.E ±	± 17,74	± 4,33	±1,15		±1,9		±1,38			

* Componentes IRI = componentes insulino - inmunoreactivos

** La concentración de las componentes IRI, se da en relación a la insulina total circulante/ml de plasma.

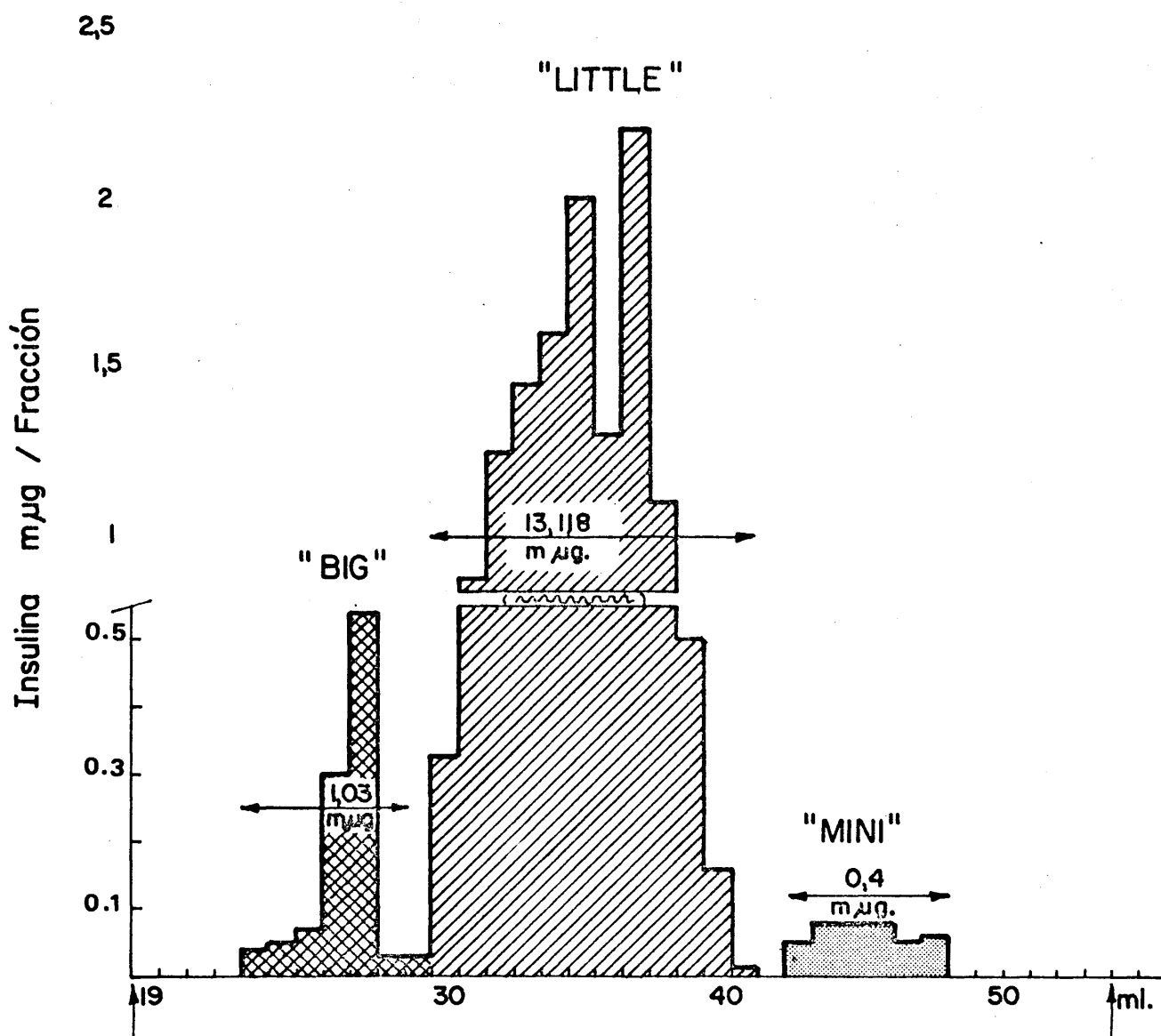





FIGURA 10.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de 1 ml de plasma (sangre de la vena porta, conejo en ayuno de 24 horas y 5 minutos despues de la estimulación con glucagón i.v. 100 μ g/ kg de peso)

En ordenadas se expresan los μ g de material inmunorreactivo recuperado/ fracción.

En abscisas representamos el número de fracciones. Las flechas a derecha e izquierda representan la localización de la albúmina y sales respectivamente. Las cifras anotadas en los picos representan la cantidad de material inmunorreactivo recuperado en las correspondientes fracciones.

-  El material inmunorreactivo localizado aproximadamente entre el pico de la albúmina y la insulina-Il25.
-  El material inmunorreactivo localizado aproximadamente a la mitad de distancia entre los picos de la albúmina y sales.
-  Corresponde al material inmunorreactivo localizado entre la insulina-Il25 y las sales plasmáticas.

Grupo IV.- COMPONENTES INSULINO-IMUNORREACTIVOS EN EL PLASMA, COMO
RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE TOLBUTAMIDA.

Exponemos a continuación los resultados obtenidos en el estudio realizado en conejos en ayuno previo de 24 horas, y estimulados con tolbutamida intravenosa (50 mg/ kg de peso). Las muestras de sangre portal heparinizada se tomaron diez minutos despues de aplicado el estímulo, coincidiendo este tiempo con la máxima secreción de la hormona.

Valoramos , la concentración total de insulina y valores glucémicos. El estudio de los componentes insulino- inmunorreactivos lo realizamos, filtrando por la columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) volúmenes de 1 ml.de plasma.

En la tabla IV se exponen los valores individuales obtenidos en las glucemias (mg de glucosa % ml de plasma), y concentraciones de insulina total (μ g/ ml de plasma). Tambien se dán, las concentraciones cuantitativas (μ g/ ml de plasma), y porcentajes respectivos de los distintos componentes insulínicos; así como el porcentaje de hormona recuperada durante el fraccionamiento de los plasmas.

En la figura 11 representamos un experimento tipo, tecnicamente considerado al pié de gráfica.

En todos los animales estudiados, observamos en primer lugar, una elevación estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la concentración total de insulina inmunorreactiva, cuyo valor medio correspon-

de a 2.875 μ g de insulina/ ml de plasma (± 0.34). Paralelamente se observa una disminución, que también es estadísticamente significativa ($p < 0.005$) en los valores que corresponden a la concentración de glucosa, siendo el promedio de 91.75 mg % ml de plasma (± 15).

El estudio de los componentes insulínicos demuestra, una elevación en la concentración cuantitativa de los tres componentes. No obstante, el porcentaje de cada uno de ellos demuestra: 1) un aumento del componente "big insulina" estadísticamente significativo ($p < 0.005$), con valores de 14 al 17 %. 2) Una disminución también significativa ($p < 0.005$) de "little insulina", cuyos porcentajes oscilan entre 76 y 83 %. 3) Una ligera elevación significativa ($p < 0.02$) del componente "mini insulina", con porcentajes del 4 al 6 % de la insulina inmunorreactiva circulante.

No hay duda, pues:

a) Después de la administración de tolbutamida hay un aumento en la concentración de insulina circulante. b) Esta estimulación en la secreción de hormona, se acompaña de una disminución en los niveles de la glucosa en plasma. c) Aunque la mayor parte de la insulina circulante corresponde a "little insulina", hay que señalar una ligera elevación del componente "big insulina".

Tabla IV – Efecto de la tolbutamida i.v. (50 mg/Kg de peso) sobre la concentración de insulina, glucosa y componentes IRI* circulantes en el plasma portal de conejos en ayuno de 24 horas.

Animales grupo IV	Glucosa en plasma (mg % ml)	Insulina en plasma (m,µg / ml)	Componentes insulino - inmunoreactivos (IRI*)						Insulina recuperada	
			"BIG" Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina			
			Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración (m µg/ml)	%
1	98	2,9	0,4118	14,2	2,32	80,0	0,153	5,3	2,659	91,7
2	73	3,0	0,5250	17,5	2,289	76,3	0,186	6,2	2,712	90,4
3	86	2,4	0,3120	13,0	1,992	83,0	0,096	4,0	2,256	94,0
4	110	3,2	0,4800	15,0	2,585	80,8	0,134	4,2	3,168	99,0
Media	91,75	2,875		14,92		80,02		4,92		
DE ±	±15,00	±0,34		±190		±2,79		±1,02		

* Componentes IRI = componentes insulino – inmunoreactivos

** La concentración de los componentes IRI, se da en relación a la insulina total circulante/ml de plasma

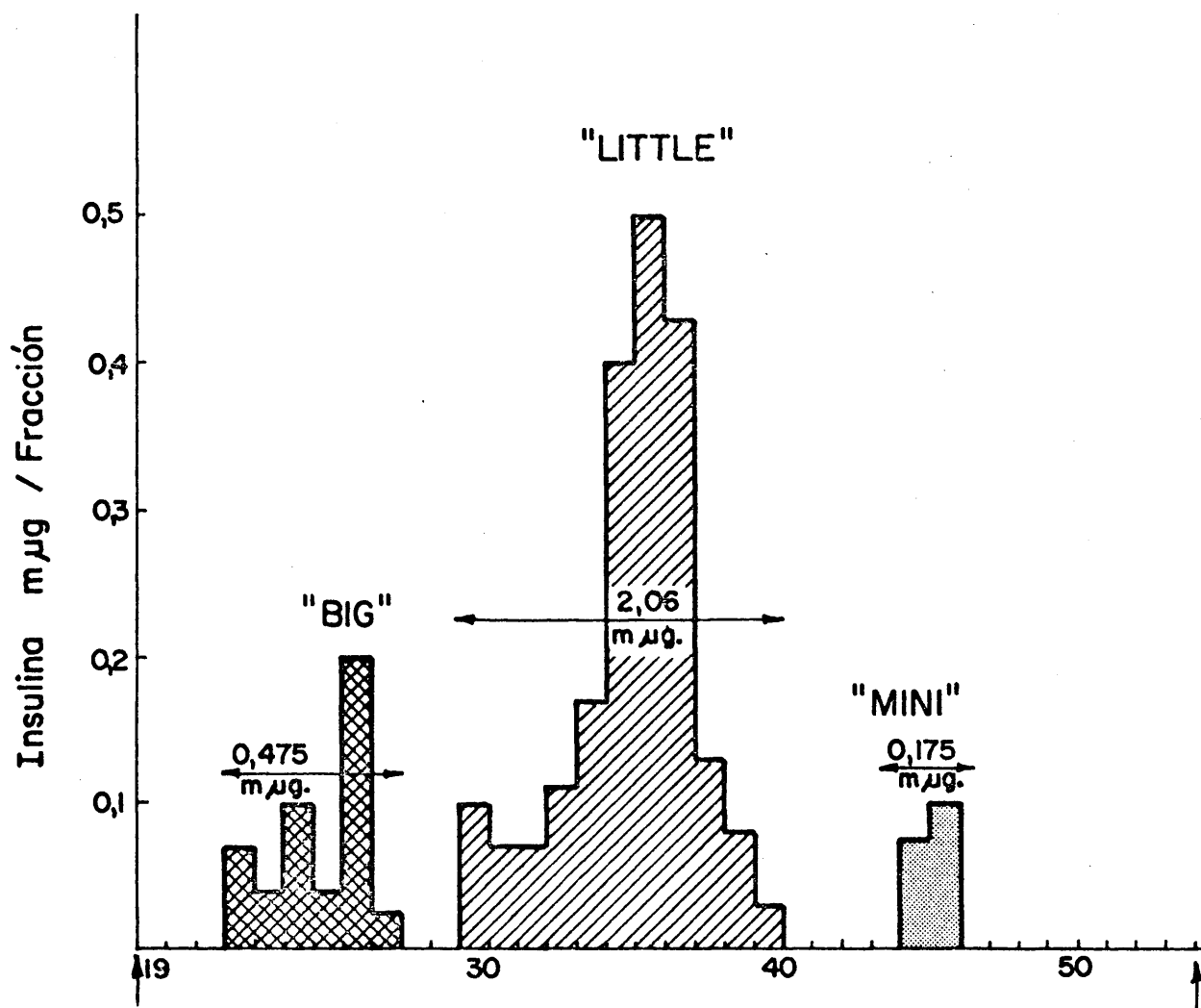





FIGURA 11.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de 1 ml de plasma (sangre de la vena porta, conejo en ayuno de 24 horas y 10 minutos después de la estimulación con tolbutamida i.v. 50 mg/ kg de peso)

En ordenadas se expresan los mμg de material inmunorreactivo recuperado/ fracción.

En abscisas representamos el número de fracciones. Las flechas a derecha e izquierda representan la localización de la albúmina y las sales, respectivamente. Las cifras anotadas en los picos representan la cantidad de material inmunorreactivo recuperado en las correspondientes fracciones.

-  El material inmunorreactivo localizado aproximadamente entre el pico de la albúmina y la insulina-I125.
-  El material inmunorreactivo localizado a la mitad de distancia entre los picos de la albúmina y las sales.
-  Corresponde al material inmunorreactivo localizado entre la insulina-I125 y las sales plasmáticas.

Grupo V.- COMPONENTES INSULINO-IMUNORREACTIVOS EN EL PLASMA, COMO

RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE SECRETINA.

Dentro de este grupo se han estudiado dos situaciones experimentales: A y B.

A, que comprende el estudio de conejos en ayuno de 24 horas.

B, que incluye animales sometidos previamente a un ayuno prolongado de 48 horas.

A continuación exponemos los resultados obtenidos en ambas situaciones, despues de la administración intravenosa de la hormona intestinal secretina (1.5 U/ kg de peso). Las muestras de sangre portal heparinizada se obtuvieron, coincidiendo con la máxima secreción de insulina, un minuto despues de la aplicación del estímulo, (142).

En todos los animales se valoraron concentraciones de glucosa e insulina total. El estudio de los componentes insulínicos se realizó, filtrando por columnas de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) volúmenes de dos ml de plasma en los animales del apartado A, y de un ml para los del B; siempre de acuerdo para obtener el máximo de garantía adecuado a las necesidades del rigor experimental.

Los resultados individuales de los animales estudiados en el apartado A, quedan reseñados en la tabla V. Como en todo nuestro estudio, damos los valores de las glucemias expresados en mg de glucosa % ml de plasma, y de insulina total expresados como $\mu\text{ug/ ml}$ de plasma.

Los componentes insulino- inmunorreactivos quedan reflejados en su concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma), y porcentaje respectivo. Al mismo tiempo se da el porcentaje de hormona recuperada en las cromatografías.

Se ha podido demostrar en primer lugar, un aumento en el nivel de insulina circulante, cuyo promedio de $5.345 \mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma (± 1.06) es estadísticamente muy significativo ($p < 0.001$), al compararlo con su respectivo grupo control. Frente a esto, hay un mantenimiento en los límites de lo normal de los valores glucémicos, con un promedio que corresponde a 162.04 mg de glucosa $\% \text{ ml}$ de plasma (± 15.96), siendo por tanto no estadísticamente diferente ($p > 0.5$).

El porcentaje de la hormona recuperada fué siempre de 90 a 100 %.

El estudio de los componentes insulínicos, señala un hecho de gran interés. Si bien la concentración cuantitativa ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de los tres componentes (" big insulina", "little insulina" y " mini insulina"), está lógicamente aumentada como consecuencia de la elevación de la insulina total, los valores porcentuales de dichos componentes sufren una gran alteración, con respecto al patrón general encontrado no solo en el grupo control, sino incluso en todas las situaciones anteriormente estudiadas.

La principal significación aparece expuesta en el experimento tipo, figura 12, y tabla V con una elevación muy considerable en el porcentaje del componente " mini insulina" ($p < 0.001$), cuyos valores co-

rresponden de un 28 a 57 % de la insulina total valorada por el radioinmunoensayo. A su vez, el componente "big insulina" se encuentra dentro de las proporciones consideradas en el grupo control, yá que no excede el porcentaje de un 5 a 9 % ($p > 0.5$). Sin embargo, por lo que se refiere a "little insulina", sus porcentajes son significativamente inferiores ($p < 0.001$), comprendiendo sus valores del 38 al 57 % de la hormona total valorada por el inmunoensayo.

De acuerdo con estos resultados, podemos concluir que: 1) La hormona intestinal secretina, produce una rápida y marcada elevación en los niveles de insulina circulante. 2) No hay modificaciones apreciables en los valores glucémicos. Este hecho de importancia trascendental en nuestro estudio, ha sido observado en grán número de trabajos publicados (142,172). Hasta la fecha, no se ha encontrado una explicación definitiva; nosotros pensamos que pueden aportar un punto de aclaracion los resultados obtenidos en el estudio de las características cromatográficas de la hormona circulante, y que corresponda al elevado porcentaje en que se encuentra el componente "mini insulina" en los animales sometidos a esta situación experimental. La actividad biológica, naturaleza química y función fisiologica de este componente, son por el momento completamente desconocidas.

Los resultados individuales de los animales pertenecientes al

Tabla V - Efectos de la secretina i.v. (1,5 U/Kg de peso) sobre la concentración de insulina, glucosa y componentes IRI* circulantes en el plasma portal de conejos en ayuno de 24 horas.

Animales Grupo V.A.	Glucosa en plasma (mg %ml)	Insulina en plasma (m μ g/ml)	Componentes insulino - unioreactivos (IRI*)								Insulina recuperada	
			"BIG" Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina					
			Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración m μ g / 2 ml	%
1	159,25	6,30	0,567	9,00	3,969	63,00	1,764	28,0	12,300	97,61		
2	168,35	4,50	0,214	4,77	1,800	40,00	2,565	57,0	8,225	91,38		
3	156,00	7,00	0,630	9,00	3,570	51,00	2,800	40,0	12,800	91,43		
4	139,40	3,98	0,189	4,76	1,515	38,09	2,272	57,1	7,875	98,90		
5	187,20	5,00	0,350	7,00	2,850	57,00	1,800	36,0	9,500	95,00		
Media	162,04	5,345		6,90		49,81		43,62				
D. E \pm	$\pm 15,96$	$\pm 1,06$		$\pm 2,12$		$\pm 10,73$		± 13				

* Componentes IRI = Componentes insulino - inmunoreactivos

** La concentración de los componentes IRI, se da en relación a la insulina total circulante / ml. de plasma

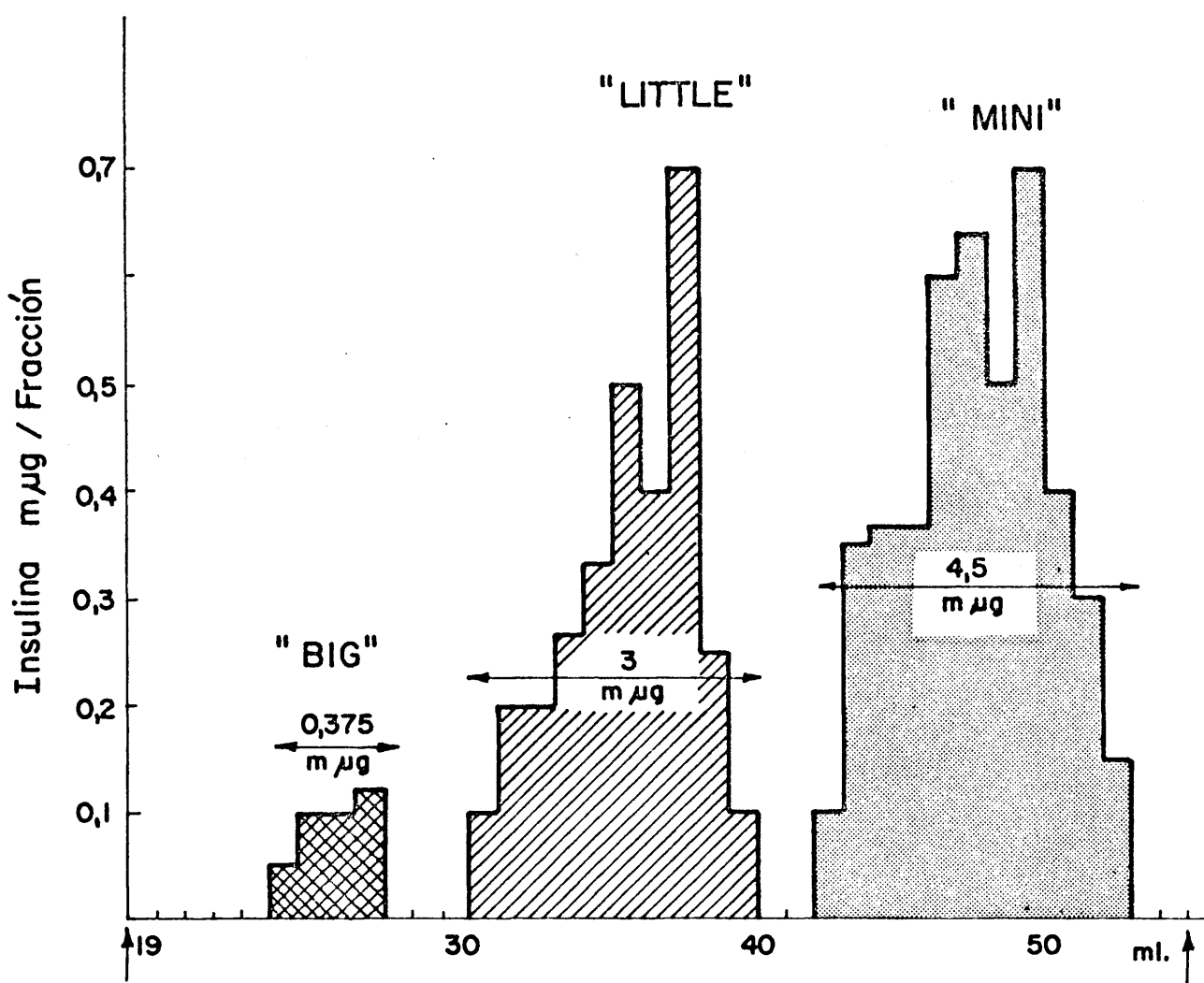


FIGURA 12.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de dos ml de plasma (sangre de la vena porta, conejo en ayuno de 24 horas y un minuto despues de la estimulación con secretina i.v. 1.5 U/ kg de peso).

En ordenadas se expresan los μg de material inmunorreactivo recuperado/ fracción.

En abscisas representamos el número de fracciones. Las flechas a derecha e izquierda representan la localización de la albúmina y las sales, respectivamente. Las cifras anotadas en los picos representan la cantidad de material inmunorreactivo recuperado en las correspondientes fracciones.

Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente entre el pico de la albúmina y la insulina-Il25

Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente a la mitad de distancia entre los picos de la albúmina y las sales plasmáticas

Corresponde al material inmunorreactivo localizado entre la insulina-Il25 y las sales del plasma.

apartado B (ayuno previo de 48 horas) se exponen en la tabla VI y figura 13.

Siguiendo la sistemática general de nuestro estudio, damos la concentración de insulina total en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma, y los valores correspondientes a las glucemias en mg de glucosa $\%$ ml de plasma. Así mismo, se expresan los porcentajes de hormona recuperada en las cromatografías; y de los componentes insulínicos señalamos sus concentraciones cuantitativas ($\mu\text{g}/\text{ml}$) y valores porcentuales.

Como en los animales del apartado anterior, hay una marcada elevación en la concentración total de insulina ($p < 0.001$), con valores medios de $5.43 \mu\text{g}$ de insulina/ ml de plasma (± 1.62). No hay cambios apreciables en las concentraciones de glucosa, correspondiendo sus valores a un promedio de $138 \text{ mg } \%$ ml de plasma (± 23.4), ($p > 0.001$).

En cuanto a los componentes insulínicos, al comparar los datos obtenidos en estos animales con su respectivo grupo control, observamos: a) Una marcada elevación del componente "mini insulina" ($p < 0.001$), con porcentajes del 25 al 49 $\%$ de la hormona total circulante. b) Un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) del componente "big insulina", cuyos valores porcentuales corresponden del 19 al 37 $\%$. c) Una disminución altamente significativa de "little insulina" ($p < 0.001$), que muestra porcentajes del 33 al 44 $\%$ de la hormona total.

Tabla VI - Efectos de la secretina i.v. (1,5 U/Kg de peso) sobre la concentración de insulina, glucosa y componentes IRI* circulantes en el plasma portal de conejos en ayuno de 48 horas.

Animales Grupo V.B	Glucosa en plasma (mg % ml)	Insulina en plasma (mµg /ml)	Componentes insulino - inmunoreactivos (IRI*)								Insulina recuperada	
			"BIG" Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina					
			Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg /ml)	%	Concentración** (m µg /ml)	%	Concentración (m µg/ml)	%
1	164	4,10	0,786	19,18	1,839	44,86	1,507	36,78	4,04	98,53		
2	106	4,00	0,840	21,00	1,680	42,00	1,480	37,00	3,80	95,00		
3	156	7,84	2,116	27,00	1,803	23,00	3,841	49,00	6,54	83,48		
4	139	6,24	1,809	29,00	1,996	32,00	2,433	39,00	4,38	70,30		
5	125	5,00	1,850	37,00	1,800	36,00	1,250	25,00	3,91	78,30		
Media	138	5,436		26,63		37,57		37,35				
D.E ±	± 23,42	± 1,625		± 7,08		± 5,64		± 8,54				

* Componentes IRI = Componentes insulino - inmunoreactivos

** La concentración de los componentes IRI, se da en relación a la insulina total circulante / ml de plasma

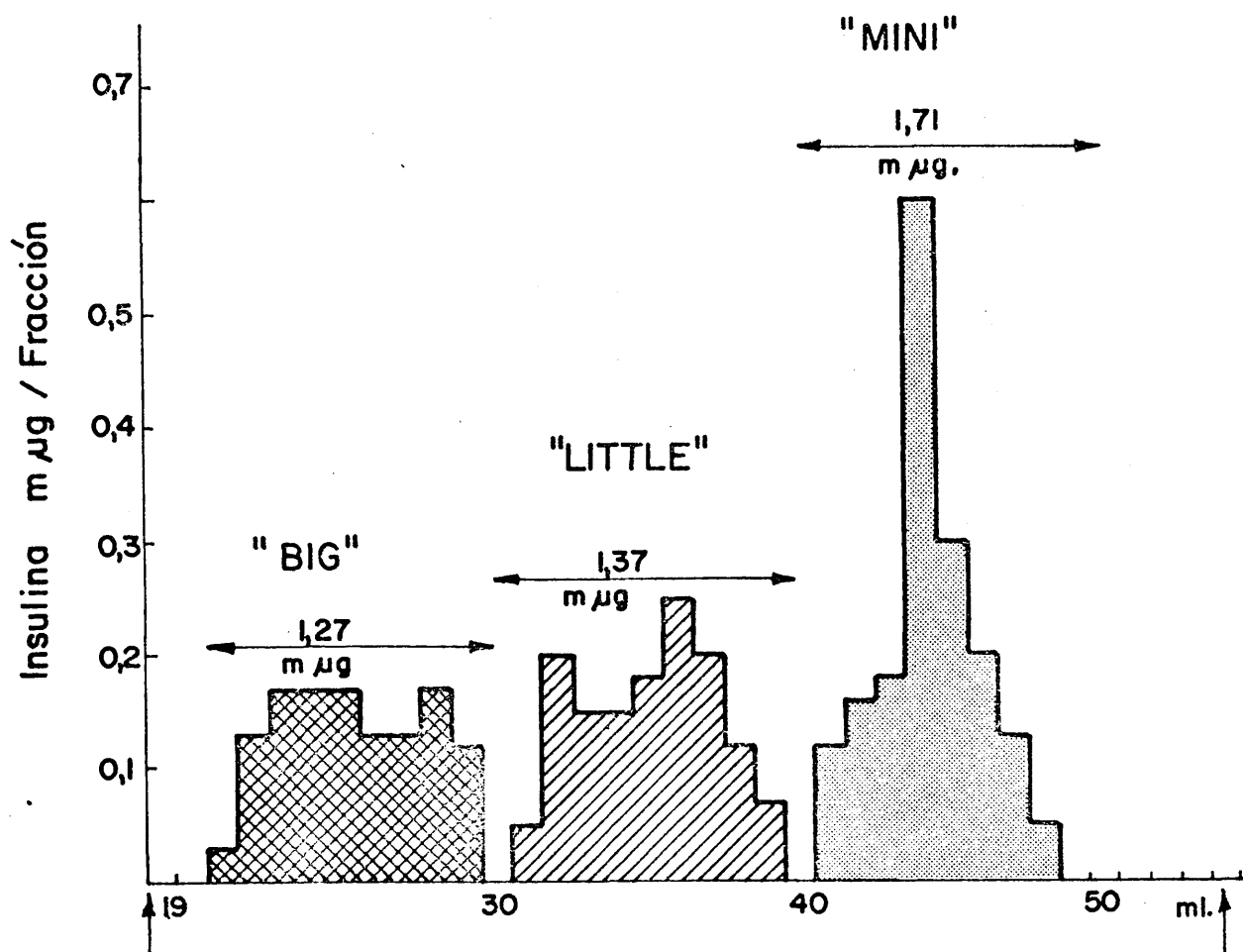

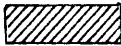
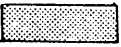


FIGURA 13.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de 1 ml de plasma (sangre de la vena porta, conejo en ayuno de 48 horas y 1 minuto despues de la estimulación con secretina i.v. 1.5 U/ kg de peso).

En ordenadas se expresan los mµg de material inmunorreactivo recuperados/ fracción.

En abscisas representamos el número de fracciones. Las flechas a derecha e izquierda representan la localización de la albúmina y las sales, respectivamente. Las cifras anotadas en los picos representan la cantidad de material inmunorreactivo recuperado en las correspondientes fracciones.

-  Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente entre el pico de la albúmina y la insulina-II25
-  Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente a la mitad de distancia entre los picos de la albúmina y las sales plasmáticas
-  Corresponde al material inmunorreactivo localizado entre la insulina-II25 y las sales del plasma.

De lo anteriormente expuesto, podemos sugerir los siguientes puntos: 1) La secretina es un potente estimulante de la secreción de insulina. 2) Su acción es rápida e intensa, alcanzando valores altos entre uno y dos minutos después de aplicado el estímulo. 3) La elevada concentración de hormona circulante, no se acompaña de cambios concomitantes en los niveles glucémicos. 4) Un porcentaje muy elevado de la insulina secretada por las células β como respuesta a la secretina, corresponde al componente "mini insulina". 5) Se observa también, una marcada diferencia en el comportamiento del componente "big insulina", en los animales pertenecientes a ambas situaciones experimentales (A y B); mientras en el grupo A este componente muestra valores porcentuales similares a los animales control, los conejos en ayuno de 48 horas (B) presentan una elevación de dicho componente.

En la Discusión se comentará ampliamente la trascendencia de estos resultados, y su posible relación a la situación de ayuno prolongado.

Control inmunológico de las hormonas utilizadas como estímulos insulino-secretores.

Las hormonas secretina, pancreocimina y glucagón, no tienen de hecho reacción inmunológica cruzada con los antisueros específicos anti-insulina. A pesar de que las preparaciones utilizadas en este estudio son muy puras, y no están contaminadas de insulina, era de un

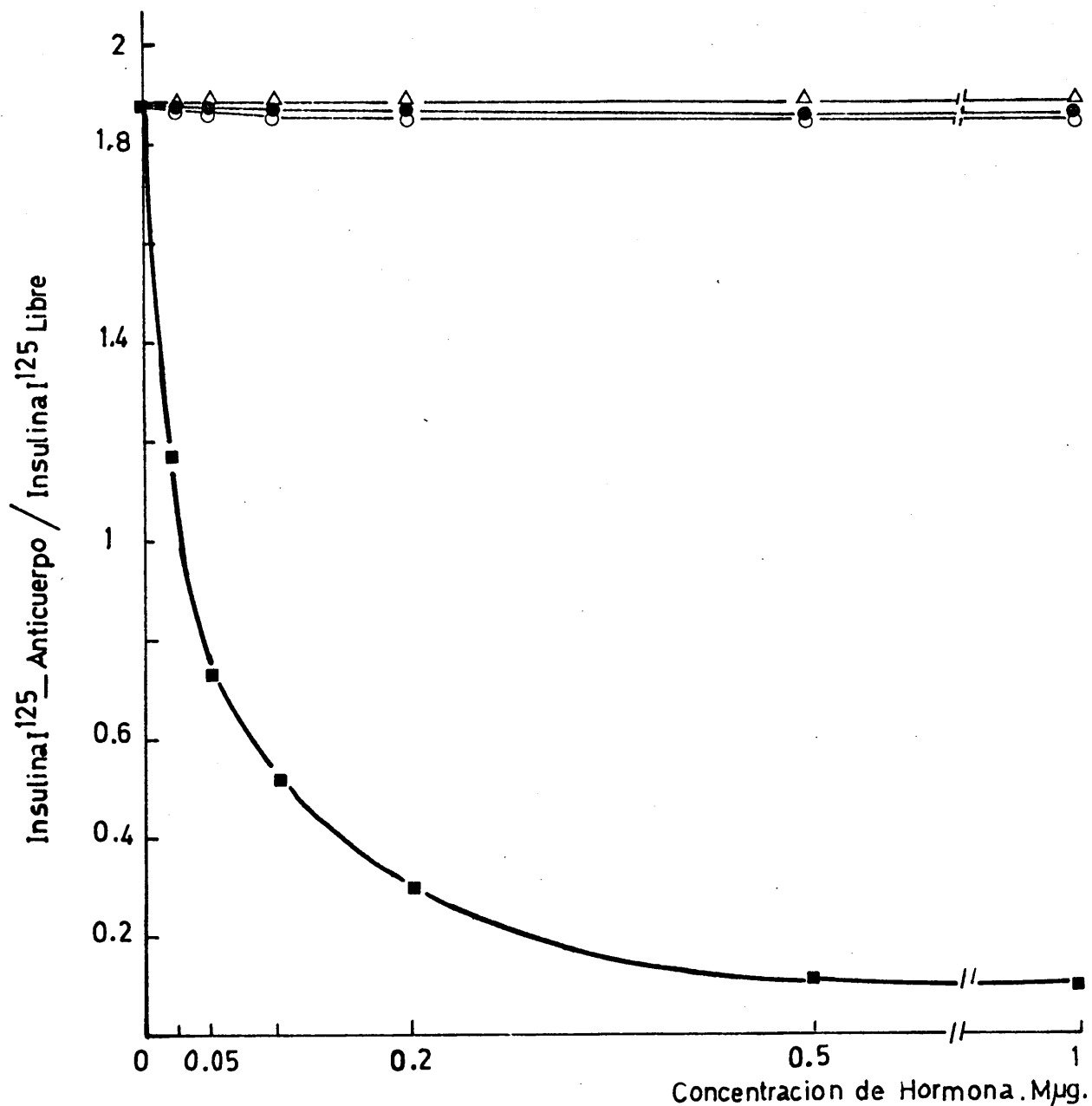


FIGURA 14.- Ausencia de reacción inmunológica con el antisue-
ro anti-insulina de porcino (Lote K 9223) de las
preparaciones cristalizadas de Δ - Δ -secretina, O-O-pancreocimina
y \bullet - \bullet -glucagón.
La valoración se realizó frente a una curva standard de insulina
cristalizada de origen bovino \blacksquare - \blacksquare -.

interés básico su comprobación en nuestro sistema.

Para ello, los diferentes lotes de estas hormonas se analizaron radioinmunologicamente frente al antisuero específico anti-insulina utilizado en nuestras valoraciones. En la figura 14 se observa, que la secretina, pancreocimina y glucagón permanecieron inertes, no mostrando ningún grado de reacción inmunológica con estos antisueros.

Experimento complementario del grupo V.

De acuerdo con los resultados obtenidos en todos los animales del grupo experimental V, consideramos de gran interés comprobar si el comportamiento que presenta el componente "mini insulina", muy elevado después de la administración de secretina, es específico de la acción aguda de esta hormona intestinal.

Los resultados aportados en la literatura por Unger, y más recientemente por Chisholm (142,172) entre otros, señalan que, la acción de la secretina sobre la secreción de insulina es de efectos rápidos, intensos y pasajeros, alcanzando la hormona su concentración máxima en la sangre, uno ó dos minutos después de aplicado el estímulo, para recuperar los valores basales dentro de los diez a quince minutos siguientes.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, a un conejo en ayuno de 48 horas se le administró secretina intravenosa (1.5 U/ kg de peso),

de la manera ya expuesta. Se tomaron muestras de sangre portal heparinizada dentro del primer minuto, y tambien a los noventa minutos despues de aplicado el estímulo. Dos ml de plasma de cada uno de los momentos experimentales aludidos, se filtraron por columnas de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm), valorando radioinmunologicamente las fracciones colectadas de la manera ya descrita.

La figura 15 representa el experimento completo. La parte superior corresponde a los componentes insulínicos valorados en el plasma obtenido un minuto despues de aplicada la secretina. La parte inferior muestra los componentes circulantes en el plasma tomado noventa minutos despues de la estimulación.

En los dos tiempos del experimento se observa claramente, la existencia de los tres componentes insulínicos, apareciendo los componentes "big insulina" y "mini insulina" muy elevados en el experimento que recoge los resultados del primer minuto despues de la aplicación de la secretina (parte superior de la fig.); mientras que noventa minutos despues (parte inferior de la fig.) el patron de los componentes insulínicos ha recuperado sus porcentajes basales,

Este hecho parece indicar la grán posibilidad, de que las alteraciones observadas en el patron de los componentes insulino-inmunorreactivos circulantes y debidas a la secretina, son pasajeras y posiblemente debidas a la puesta en marcha de mecanismos enzimáticos presen-

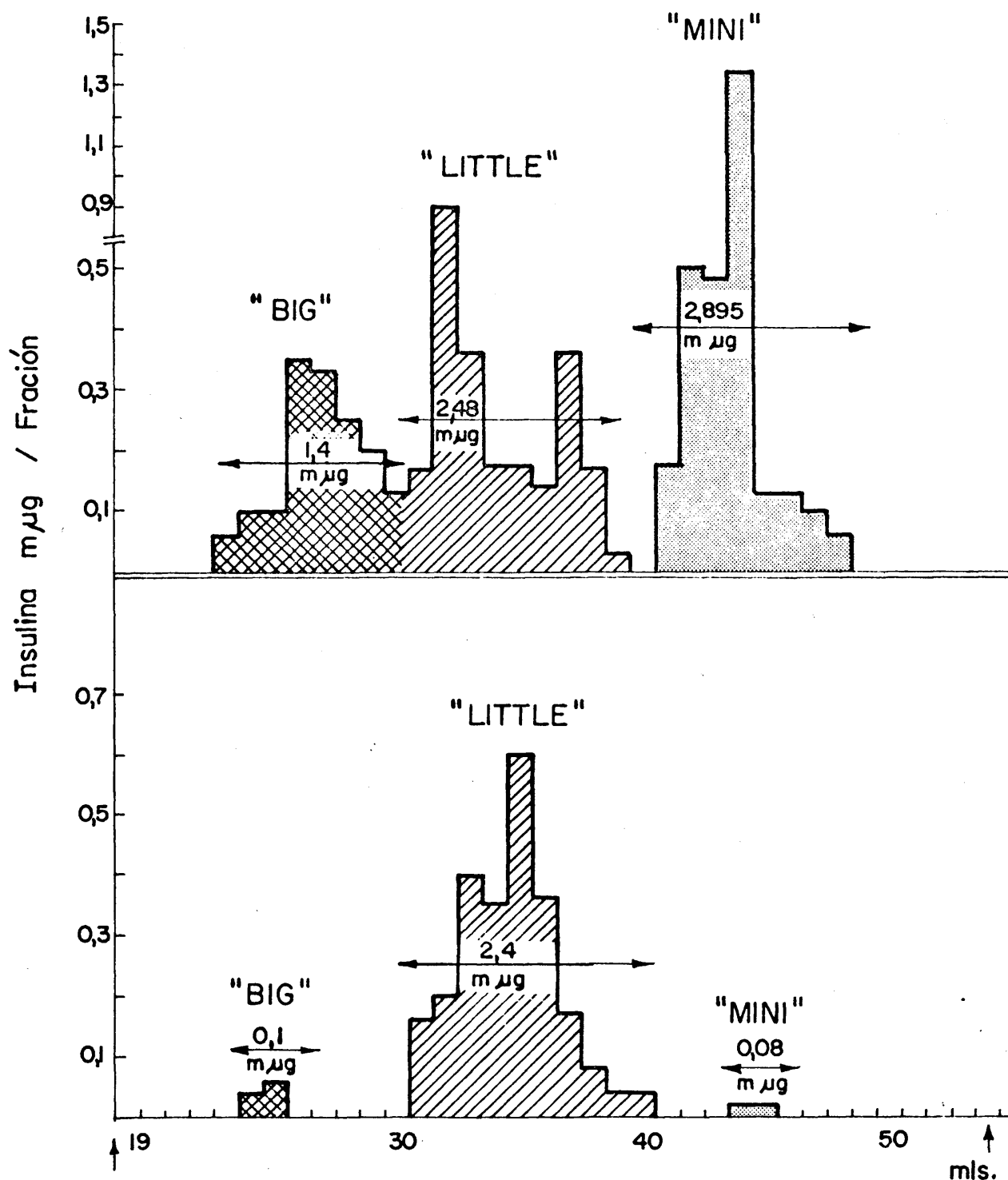


FIGURA 15.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de 2 ml de plasma (sangre de la vena porta, conejo en ayuno de 48 horas y estimulado con secretina i.v. 1.5 U/ kg de peso)

La parte superior de la gráfica corresponde a la sangre obtenida 1 minuto despues de aplicado el estímulo.

La parte inferior de la gráfica corresponde al mismo animal en el que la sangre se tomó a los 90 minutos de estimulado.

tes en la célula β del islote, para favorecer la secreción de dichos componentes a la circulación portal. Esto realmente representaría una nueva línea de trabajo que nos proponemos estudiar en un futuro próximo.

Grupo VI.- COMPONENTES INSULINO-IMUNORREACTIVOS EN EL PLASMA, COMO
RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE PANCREOCIMINA.

Este grupo experimental comprende, el estudio de los efectos de la hormona intestinal pancreóocimina sobre la secreción de insulina, valores glucémicos, y patron cualitativo de los componentes insulínicos circulantes en la sangre de la vena porta de conejos sometidos a las situaciones experimentales: A) Ayuno de 24 horas, y B) ayuno prolongado de 48 horas.

Siguiendo la sistemática general, cada animal recibe una dosis única de 100 U de pancreocimina intravenosa. Las muestras de sangre portal heparinizada se tomaron un minuto despues de aplicado el estímulo, para coincidir con los valores máximos de insulina circulante (142).

Para el estudio de los componentes insulino- inmunorreactivos, los volúmenes de plasma filtrados por la columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm), fueron de dos ml en los animales pertenecientes al grupo A, y de un ml para los del grupo B.

Los resultados individuales de los animales correspondientes al grupo A, quedan expuestos en la tabla VII. Como en todos los grupos estudiados, damos la concentraciones de insulina circulante expresadas en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma, y los valores glucémicos en mg de glucosa $\%$ ml de plasma. Asi mismo quedan reunidos los valores cuantitativos ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

de los componentes insulínicos y sus porcentajes respectivos. Por último, exponemos los valores porcentuales de la hormona recuperada en las cromatografías de los diferentes plasmas.

En todos los animales estudiados, aparece claramente una elevación marcadamente significativa en la concentración total de insulina circulante ($p < 0.001$), cuyo valor medio es de 6.717 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma (± 2.46). De igual manera puede observarse un mantenimiento de los niveles glucémicos dentro de los límites normales ($p > 0.5$), con un promedio de 137.6 mg de glucosa $\% \text{ ml}$ de plasma (± 26.96).

El porcentaje de la hormona recuperada en las cromatografías de los plasmas, fué siempre del 85 al 97 %.

El estudio de los componentes insulino-inmunorreactivos, queda graficamente expuesto en la figura 16 (experimento tipo), y tabla VII. Cabe señalar, que existe una elevación en la concentración cuantitativa de los tres componentes "big insulina", "little insulina" y "mini insulina", consecutiva al aumento de los niveles de insulina total circulante. No obstante, su proporcionalidad comparada con los valores obtenidos en su respectivo grupo control (animales en ayuno de 24 horas), demuestra: a) un mantenimiento dentro de los límites considerados como normales, del componente "big insulina" ($p > 0.1$), con valores que oscilan entre 2 y 4 %. b) una disminución muy significativa ($p < 0.005$) del componente "little insulina", cuyos porcen-

Tabla VII - Efectos de la pancreozymina i.v. (100 U/ animal), sobre la concentración de insulina, glucosa y componentes IRI * circulantes en el plasma portal de conejos en ayuno de 24 horas.

Animales Grupo VI	Glucosa en plasma (mg %ml)	Insulina en plasma (m ugr/ml)	Componentes insulino-inmunoreactivos (IRI*)						Insulina recuperada	
			"BIG" Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina			
			Concentraci ^{***} (m µgr/ml)	Concentraci ^{***} %	Concentraci ^{***} (m µgr/ml)	Concentraci ^{***} %	Concentraci ^{***} (m µgr/ml)	Concentraci ^{***} %		
1	170	5,965	0,226	3,80	5,070	85,0	0,638	10,7	10,499	88,0
2	141	8,900	0,356	4,00	7,030	79,0	1,513	17,0	17,600	98,8
3	156	9,242	0,369	4,00	7,023	76,0	1,848	20,0	15,835	85
4	115	6,280	0,086	1,37	5,400	86,0	0,734	11,7	11,932	95
5	106	3,200	0,108	3,40	2,579	80,6	0,512	16,0	6,208	97
Media	137,6	6,717	3,31		81,32		15,08			
D.E ±	± 26,96	± 2,46	±1,11		±4,17		±3,85			

* Componentes IRI = componentes insulino inmunoreactivos

** La concentración de los componentes IRI, se da en relación a la insulina total circulante/ml de plasma

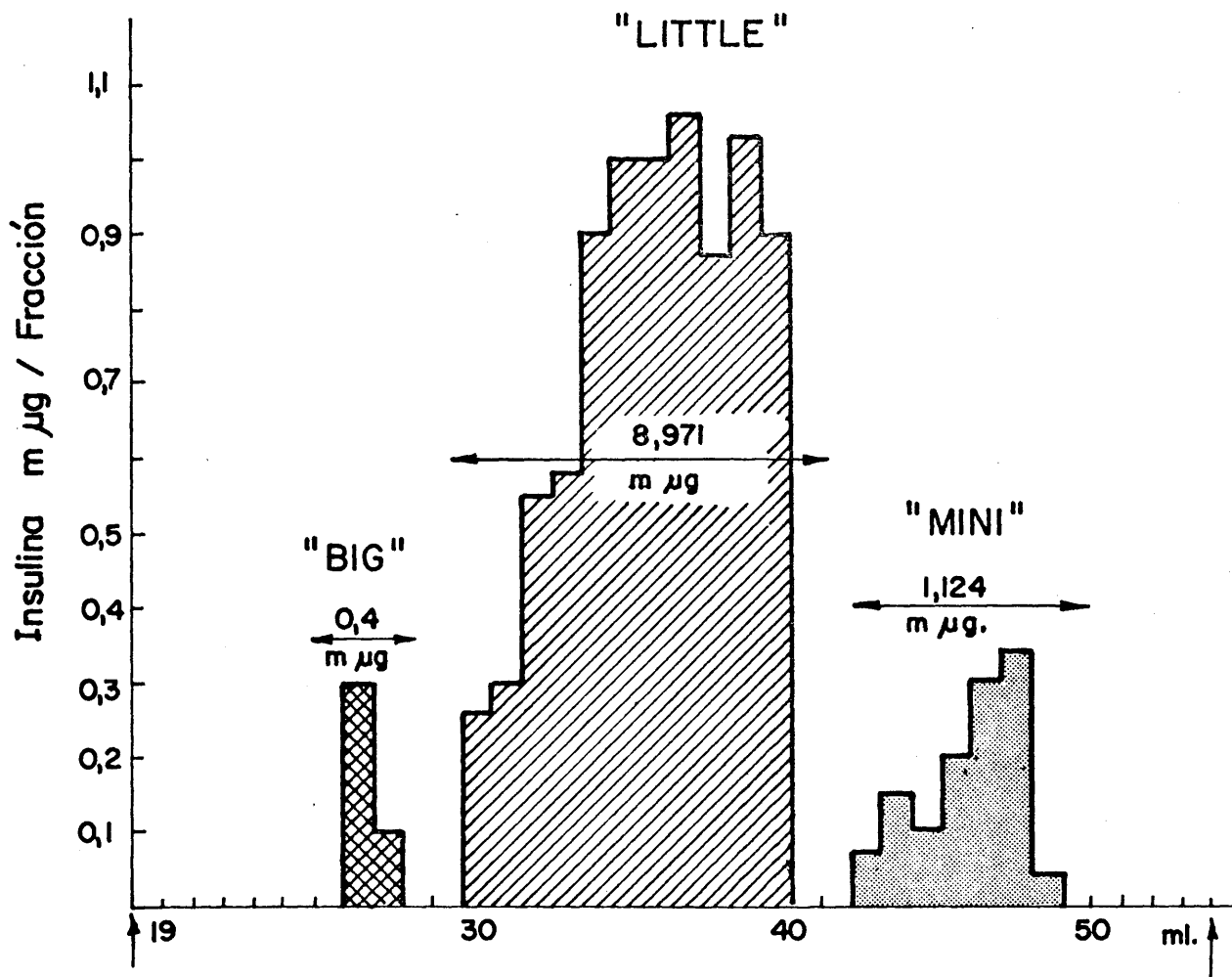





FIGURA 16.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de 2 ml de plasma (sangre de la vena porta, conejo en ayuno de 24 horas y 1 minuto después de la estimulación con pancreocimina i.v. 100 U)

En ordenadas se expresan los μg de material inmunorreactivo recuperados/ fracción.

En abscisas representamos el número de fracciones. Las flechas a derecha e izquierda representan la localización de la albúmina y las sales, respectivamente. Las cifras anotadas en los picos representan la cantidad de material inmunorreactivo recuperado en las correspondientes fracciones.

-  Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente entre el pico de la albúmina y la insulina-II25
-  Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente a la mitad de distancia entre los picos de la albúmina y las sales plasmáticas
-  Corresponde al material inmunorreactivo localizado entre la insulina-II25 y las sales del plasma.

tajes son del 76 al 86 %; y una elevación altamente significativa del componente "mini insulina" ($p < 0.001$), que comprende porcentajes del 11 al 20 % de la hormona circulante.

Ante estos resultados podemos señalar que: 1) La pancreocimina es un potente estímulo de la secreción de insulina. 2) Su acción rápida e intensa, no se acompaña de alteraciones apreciables en los niveles glucémicos, que se mantienen dentro de los límites normales. 3) El patrón cualitativo de los componentes insulínicos, demuestra como única nota de interés, una elevación del componente "mini insulina", no tan marcada como en el caso de la hormona intestinal secretina; conservándose dentro de los porcentajes normales el componente "big insulina", y estando ligeramente disminuido el componente "little insulina".

Los resultados individuales del estudio llevado a cabo en los animales pertenecientes al grupo B, quedan reseñados en la tabla VIII, y figura 17 correspondiente a un experimento tipo.

El valor medio encontrado en esta situación experimental corresponde a 4.339 μg de insulina/ ml de plasma, estando estadísticamente elevado al compararlo a su respectivo grupo control ($p < 0.001$). Para la glucosa, el promedio encontrado fué de 123.2 mg % ml de plasma (± 13.05), no mostrando alteración estadísticamente significativa ($p >$

0.1).

El porcentaje de hormona recuperada correspondió de un 90 a 98 %.

El estudio de los componentes insulínicos señala en primer lugar, una elevación de la concentración cuantitativa de los tres componentes, si bien sus valores porcentuales guardan la misma proporción que en los animales de su grupo control: "big insulina" - 7 al 8 %, "little insulina" - 89 al 92 % y "mini insulina" - 3 al 4 % ($p > 0.5$, $p > 0.3$ y $p > 0.7$, respectivamente).

De los resultados aportados por ambos grupos experimentales, se deduce:

1) La secreción de insulina como respuesta a la estimulación con pancreocimina es rápida, intensa y alcanza valores muy altos, dentro de los primeros minutos después de aplicado el estímulo. 2) Las altas concentraciones de hormona circulante, no se acompañan de alteraciones en los niveles glucémicos. Este hecho de gran interés, en el caso de la pancreocimina puede estar justificado por la acción secundaria de este estímulo sobre la secreción de glucagón, ya observada por Unger y col (142), y representaría la consecuencia más fisiológica del mantenimiento en los límites de lo normal, de la concentración de glucosa en sangre. 3) Los componentes insulino- inmunorreactivos circulantes señalan, una elevación del componente "mini insulina" en los animales del grupo A, manteniéndose con características de normalidad.

Tabla VIII - Efectos de la pancreozymina i.v. (100 U/animal) sobre la concentración de insulina, glucosa y componentes IRI*
circulantes en el plasma portal de conejos en ayuno de 48 horas.

Animales Grupo VI _B	Glucosa en plasma (mg % ml)	Insulina en plasma (m μ g/ml)	Componentes insulino - inmunoreactivos (IRI*)						Insulina Recuperada	
			"BIG" Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina			
			Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración (m μ g/ml)	%
1	127	6,134	0,466	7,60	5,416	88,30	0,251	4,10	6,010	98
2	106	3,170	0,209	6,60	2,884	91,00	0,078	2,48	3,012	95
3	128	6,040	0,453	7,50	5,516	91,34	0,070	1,16	5,80	96
4	115	2,500	0,165	6,60	2,275	91,00	0,060	2,40	2,20	88
5	140	4,155	0,277	6,68	3,766	90,64	0,110	2,67	3,74	90
Media	123,2	4,399	6,99			90,45		2,56		
D. E \pm	$\pm 13,05$	$\pm 1,64$	$\pm 0,51$			$\pm 1,23$		$\pm 1,05$		

* Componentes IRI = Componentes insulino - inmunoreactivos

** La concentración de los componentes IRI se da en relación a la insulina total circulante /ml. de plasma

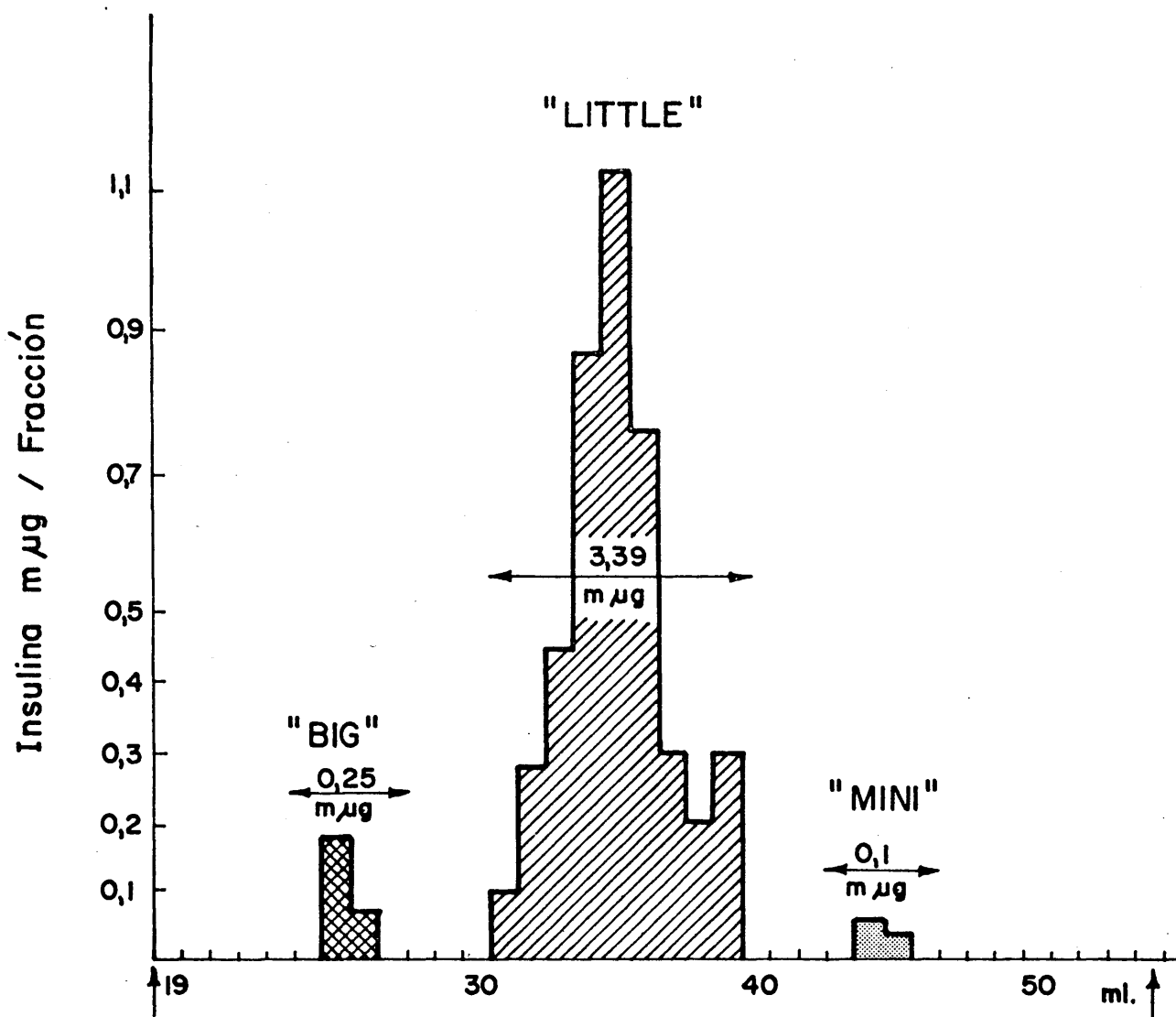





FIGURA 17.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de 1 ml de plasma (sangre de la vena porta, conejo en ayuno de 48 horas y 1 minuto despues de la estimulación con pancreocimina i.v. 100 U).

En ordenadas se expresan los $m\mu g$ de material inmunorreactivo recuperados/ fracción.

En abscisas representamos el número de fracciones. Las flechas a derecha e izquierda representan la localización de la albúmina y las sales, respectivamente. Las cifras anotadas en los picos representan la cantidad de material inmunorreactivo recuperado en las correspondientes fracciones.

 Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente entre el pico de la albúmina y la insulina-Il25

 Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente a la mitad de distancia entre los picos de la albúmina y las sales plasmáticas

 Corresponde al material inmunorreactivo localizado entre la insulina-Il25 y las sales del plasma.

en los del grupo B. Estos resultados podrian indicar, que la importancia de dicho componente en la regulaci3n de los niveles gluc3micos, seria de consideraci3n m3s secundaria a la fundamentalmente importante consideraci3n del efecto de la secretina y3 comentado.

Grupo VII.- COMPONENTES INSULINO-IMUNORREACTIVOS EN EL PLASMA, COMO
RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE GLUCOSA INTRAVENOSA.

A continuación exponemos los resultados obtenidos en el estudio llevado a cabo en conejos en ayuno de 24 horas y administración de glucosa intravenosa (500 mg/ kg de peso). Siguiendo la sistemática general, las muestras de sangre portal heparinizada se obtuvieron, en el tiempo comprendido entre dos a tres minutos después de aplicado el estímulo, coincidiendo con la óptima concentración de hormona circulante (174).

En todos los plasmas estudiamos la concentración de insulina total y los valores glucémicos. La valoración de los componentes insulínicos se realizó, filtrando volúmenes de un ml de plasma por columnas de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm).

En la tabla IX exponemos los valores individuales de las concentraciones de glucosa (en mg % ml de plasma), y de insulina total (en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma). Así mismo se da la concentración cuantitativa ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de los componentes insulínicos y sus porcentajes respectivos. En último término damos los valores porcentuales de la hormona recuperada en las cromatografías de los plasmas.

En todos los animales se observa una elevación muy marcada en la concentración total de insulina circulante ($p < 0.001$), con un promedio de $6.442 \mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma (± 1.013). Paralelamente se comprue-

ba una elevación altamente significativa en los niveles glucémicos ($p < 0.001$), con un valor medio que corresponde a 283 mg de glucosa % ml de plasma (± 44.2).

El porcentaje de hormona recuperada en las cromatografías de los plasmas fué siempre del 86 al 97 %.

El estudio de los componentes insulino- inmunorreactivos, señala un patron cualitativo análogo al obtenido en los animales del grupo control, con porcentajes de: "big insulina" - 3 al 7 %, "little insulina" - 88 al 95 % y "mini insulina" - 3 al 7 % de la insulina total valorada por el radioinmunoensayo ($p > 0.4$, $p > 0.9$ y $p > 0.05$ respectivamente). La figura 18 representa un experimento tipo, perteneciente al grupo experimental estudiado, y cuyas consideraciones técnicas quedan sucintamente reseñadas al pié de gráfica.

Estos resultados evidencian claramente que:

1) La administración intravenosa de glucosa, produce una elevación rápida de los niveles glucémicos, acompañada de un aumento en la concentración de insulina inmunorreactiva en sangre. 2) La acción de la glucosa intravenosa sobre la secreción de insulina es de efecto inmediato, alcanzando su punto óptimo entre uno y tres minutos despues de aplicado el estímulo. 3) El patron cualitativo de los componentes insulino-inmunorreactivos del plasma señala, una elevación cuantitativa de los tres componentes como consecuencia de la elevación de la hormona

en sangre. Sin embargo, en estas condiciones experimentales, la mayor parte de insulina circulante corresponde a "little insulina"

Tabla IX - Efectos de la glucosa i.v. (500 mg/Kg de peso) sobre la concentración de insulina, glucosa y componentes IRI* circulantes en el plasma portal de conejos en ayuno de 24 horas.

Animales Grupo VIII	Glucosa en plasma (mg %ml)	Insulina en plasma (m µg/ml)	Componentes insulino – inmunoreactivos (IRI*)								Insulina Recuperada	
			"BIG" Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina					
			Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg/ml)	%				
									Concentración (m µg/ml)	%		
			1	246	6,989	0,432	6,19	6,112	87,46	0,445	6,37	6,78
2	280	7,575	0,443	5,86	6,759	89,24	0,371	4,90	6,818	90		
3	260	5,813	0,176	3,04	5,345	91,96	0,290	5,00	5,00	86		
4	346	5,393	0,113	2,10	5,117	94,89	0,162	3,01	4,80	89		
Media	283	6,442		4,29		90,88		4,82				
D.E. ±	±44,2	±1,013		±2,04		±3,25		±1,38				

* Componentes IRI= componentes insulino - inmunoreactivos

** La concentración de los componentes IRI se da en relación a la insulina total circulante/ml. de plasma

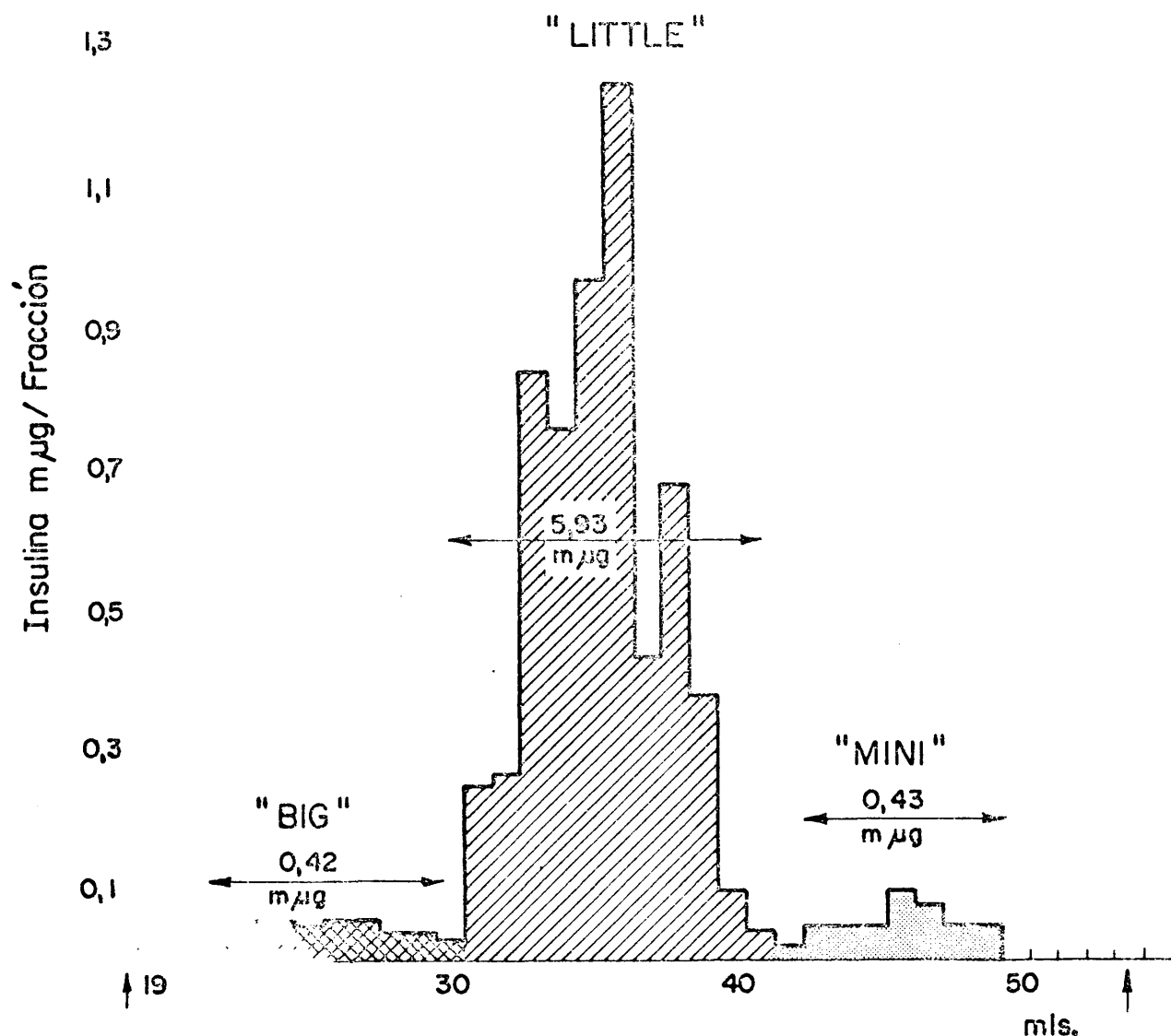





FIGURA 18.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de 1 ml de plasma (sangre de la vena porta, conejo en ayuno de 24 horas y 2 minutos después de la estimulación con glucosa i.v. 500 mg/ kg de peso).

En ordenadas se expresan los μg de material inmunorreactivo recuperados/ fracción.

En abscisas representamos el número de fracciones. Las flechas a derecha e izquierda representan la localización de la albúmina y las sales, respectivamente. Las cifras anotadas en los picos representan la cantidad de material inmunorreactivo recuperado en las correspondientes fracciones.

-  Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente entre el pico de la albúmina y la insulina-1125
-  Es el material inmunorreactivo localizado aproximadamente a la mitad de distancia entre los picos de la albúmina y las sales plasmáticas
-  Corresponde al material inmunorreactivo localizado entre la insulina-1125 y las sales del plasma

Grupo VIII.- COMPONENTES INSULINO-IMUNORREACTIVOS EN EL PLASMA, COMO
RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE GLUCOSA ORAL.

Este grupo comprende el estudio de conejos en ayuno previo de 24 horas. Siguiendo la sistemática experimental, los animales cinco horas despues de la intervención quirúrgica, recibieron por sonda intragástrica una dosis de 1 gr de glucosa/ kg de peso.

Para la extracción de las muestras de sangre portal heparinizada, los animales se dividieron en dos grupos de acuerdo al criterio siguiente:

Grupo A, que comprende los conejos a los que las muestras de sangre se les extrae 45 minutos despues de aplicado el estímulo, coincidiendo con los valores máximos de insulina circulante (172).

Grupo B, que incluye los animales a los que se les extrae la sangre portal 90 minutos despues de administrada la glucosa.

En ambos grupos valoramos concentración total de insulina inmunorreactiva y niveles glucémicos. El estudio de los componentes insulino-inmunorreactivos se realizó de manera análoga en ambos grupos, filtrando por columnas de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) volúmenes de 1 ml de plasma.

La tabla IX reúne los resultados individuales de los animales pertenecientes al grupo A. Las concentraciones de insulina total se expresan en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma. Los valores glucémicos en mg de glu-

cosa % ml de plasma. También quedan señaladas las concentraciones cuantitativas ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma) y porcentajes respectivos de los distintos componentes insulino- inmunorreactivos. Por último damos el porcentaje de hormona recuperada en las cromatografías de los plasmas.

La parte superior de la figura 19 representa el resultado de un experimento tipo.

Como respuesta a la administración de glucosa oral encontramos, junto a una ligera elevación de los niveles glucémicos ($p < 0.02$), cuyo promedio corresponde a 200.8 mg de glucosa % ml de plasma (± 13.8), un aumento muy significativo en la concentración total de insulina circulante ($p < 0.005$), con un valor medio de 3.871 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma (± 1.25)

El porcentaje de hormona recuperada en el fraccionamiento proteico de los plasmas, fué del 92 al 98 %.

El patrón cualitativo de los componentes insulino- inmunorreactivos del plasma demuestra: a) una elevación en el porcentaje del componente "big insulina", que corresponde de un 12 al 20 % ($p < 0.05$). b) una disminución altamente significativa del componente "little insulina" ($p < 0.001$), con valores que oscilan entre un 60 a 70 %. c) Un aumento también muy marcado ($p < 0.001$) del componente "mini insulina" con valores porcentuales del 13 al 25 % de la hormona total va-

lorada por el inmunoensayo.

Ante estos resultados podemos señalar que:

1) la administración de glucosa intragástrica produce una ligera hiperglucemia, que se acompaña de una elevación en los niveles de insulina en sangre. 2) Las variaciones de los niveles glucémicos en el plasma procedente de sangre de la vena porta, no son tan marcadas como las que acompañan a la administración de glucosa parenteral. 3) Los componentes insulino- inmunorreactivos circulantes, muestran claramente un aumento considerable de los componentes "big insulina" y "mini insulina", comprendiendo esta última valores hasta de un 25 % de la insulina total circulante.

El estudio individual de los animales pertenecientes al grupo B, queda resumido en la tabla X y parte inferior de la figura 19.

El promedio de insulina total circulante en estos animales, correspondió a 2.822 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma (± 0.312), estando por tanto estadísticamente elevado ($p < 0.001$). Los valores glucémicos fueron de 162.2 mg de glucosa $\%$ ml de plasma (± 20.5), lo que demuestra que, a los 90 minutos de administrada la glucosa, la glucemia ha retornado a los niveles basales ($p > 0.5$)

El estudio de los componentes insulínicos demuestra, una marcada elevación de los porcentajes correspondientes a los componentes "big

insulina" y "mini insulina", con valores respectivos de 11 al 21 % para la primera, y 17 al 20 % para la segunda, ($p < 0.001$ y $p < 0.05$). El porcentaje del componente "little insulina" está lógicamente muy disminuido ($p < 0.001$), mostrando valores que representan un 57 a 63 % de la hormona total.

Ante estos resultados cabe señalar: 1) La glucosa administrada por vía intragástrica produce una elevación en los niveles de insulina circulante, que es más acusada a los 45 que a los 90 minutos después de aplicado el estímulo. 2) Como consecuencia de la administración oral de glucosa se produce una elevación en los niveles glucémicos, que retornan a los valores normales 90 minutos después de aplicado el estímulo. 3) Los componentes insulino- inmunorreactivos del plasma señalan, una elevación del componente "big insulina" de acuerdo con los resultados publicados por Roth (108). El componente "mini insulina" muy elevado en ambos grupos experimentales, estaría más de acuerdo con el hecho observado por Chisholm y col (172), demostrando que la glucosa oral produce secreción de secretina, responsable a su vez de la secreción de insulina.

Tabla X - Efectos de la glucosa oral (1 gr/Kg de peso) sobre la concentración de insulina, glucosa y componentes IRI* circulantes en el plasma portal de conejos en ayuno de 24 horas.

Animales Grupo VIII _A	Glucosa en plasma (mg % ml)	Insulina en plasma (m μ g/ml)	Componentes insulino - inmunoreactivos (IRI*)								Insulina Recuperada	
			"BIG" Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina					
			Concentración** (m μ g/ml.)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración** (m μ g/ml)	%	Concentración (m μ g/ml)	%
1	196,0	2,551	0,357	14,0	1,556	61	0,637	25	2,50	98		
2	187,2	3,271	0,518	15,85	1,965	60,08	0,787	24,07	3,075	94		
3	200,0	4,184	0,488	11,68	2,933	70,12	0,760	18,18	3,085	92		
4	220,0	5,478	1,095	20	3,686	67,3	0,695	12,7	5,04	92		
Media	200,8	3,871		15,38		64,62		19,98				
D.E. \pm	\pm 13,8	\pm 1,25		\pm 3,52		\pm 4,87		\pm 5,72				

* Componentes IRI = componentes insulino - inmunoreactivos.

** La concentración de los componentes IRI se da en relación a la insulina total circulante/ml de plasma.

Tabla XI - Efectos de la glucosa oral (1 gr/Kg de peso) sobre la concentración de insulina, glucosa y componentes IRI* circulantes en el plasma portal de conejo en ayuno de 24 horas

Animales Grupo VIII B	Glucosa en plasma (mg %ml)	Insulina en plasma (m,µg/ml)	Componentes insulino - inmunoreactivos (IRI*)								Insulina Recuperada	
			"BIG" Insulina		"LITTLE" Insulina		"MINI" Insulina					
			Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración** (m µg/ml)	%	Concentración (m µg/ml)	%
1	164	3,08	0,369	12	1,755	57	0,819	26,6	2,833	92		
2	135	2,82	0,406	14,4	1,607	57	0,799	28,35	2,512	89		
3	150	2,40	0,504	21	1,488	62	0,408	17	2,312	96		
4	188	2,64	0,415	15,74	1,558	59,07	0,665	25,19	2,540	96,2		
5	174	3,16	0,347	11	1,897	60	0,917	29	3,110	98		
Media	162,2	2,822		14,82		59,01		25,22				
D.E ±	± 20,5	± 0,312		± 3,93		± 2,12		± 4,84				

* Componentes IRI = componentes insulino - inmunoreactivos

** La concentración de los componentes IRI se da en relación a la insulina total circulante /ml de plasma

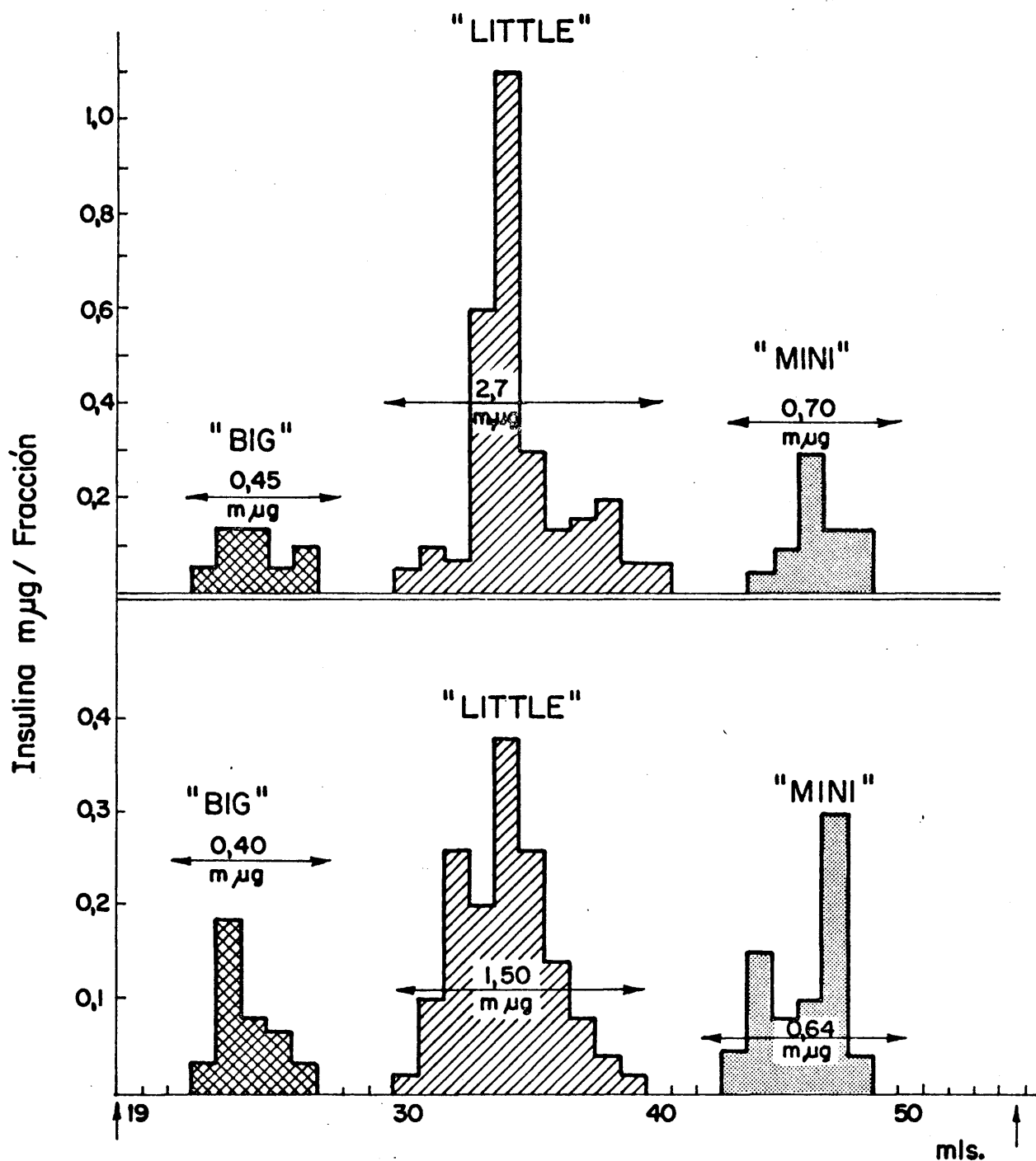


FIGURA 19.- Cromatografías en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de 1 ml de plasma (sangre de la vena porta, conejos en ayuno de 24 horas).

La parte superior de la gráfica corresponde a la sangre extraída 45 minutos después de la administración intragástrica de 1 gr de glucosa/ kg de peso.

La parte inferior de la figura corresponde a la sangre extraída a los 90 minutos de aplicado el estímulo.

AISLAMIENTO DE LOS COMPONENTES "BIG INSULINA", "LITTLE INSULINA" Y
"MINI INSULINA".-

Para poder caracterizar cromatográfica e inmunologicamente los componentes estudiados, es necesario disponer de suficiente cantidad del material a caracterizar; es decir, hay que aislar a partir del plasma cada uno de los tres componentes "big insulina", "little insulina" y "mini insulina"

Con este fin, se calibra una columna de sephadex G-50 fino (4 x 54 cm) de la manera ya expuesta en Material y Métodos (pág 93, fig. 7).

Cuarenta ml de plasma procedente de seis conejos en ayuno de 48 horas y estimulados con secretina intravenosa (1.5 U/ kg de peso), de una manera similar a la realizada en los animales del grupo VI, se filtran por dicha columna y se colectan fracciones de 4 ml. Se valora radioinmunologicamente una alícuota procedente de todas y cada una de las fracciones comprendidas entre los volúmenes de elución de la albúmina y las sales. La figura 20 muestra el patrón cromatográfico obtenido en estas condiciones expuestas.

Con las fracciones correspondientes a cada uno de los tres componentes insulínicos "big insulina", "little insulina" y "mini insulina", se hicieron tres pools que se dializaron durante 72 horas a 4°C contra carbonato amónico 20 mM; y posteriormente se liofilizaron.

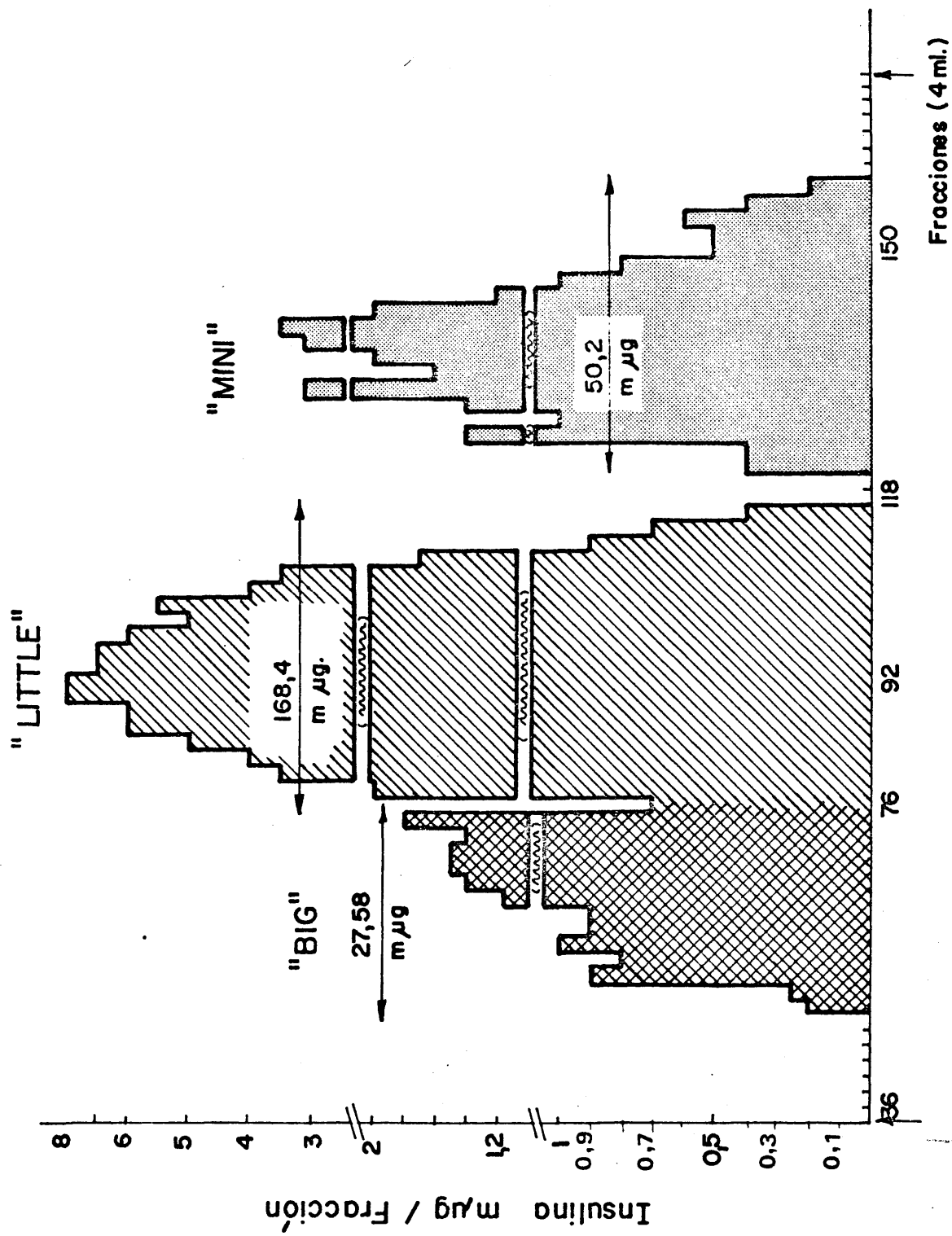


FIGURA 20

Cada uno de los tres liofilizados pertenecientes a los tres componentes insulínicos se disolvió en dos ml de tampón veronal sódico 0.05 M (pH 8.6). Este material sirve para caracterizar los componentes, cromatográfica e inmunológicamente.

CARACTERIZACION CROMATOGRAFICA

Recromatografia de los componentes "big insulina", "little insulina" y "mini insulina".

Un ml del material obtenido en el aislamiento, y procedente de cada uno de los tres componentes insulínicos, se filtró de nuevo y por separado por una columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm). Las fracciones colectadas se valoraron radioinmunológicamente.

La figura 21 representa la recromatografia de este material. Se observa como cada componente insulino- inmunorreactivo, conserva sus características cromatográficas y permanece libre de los otros componentes. Esto indica, que "big insulina", "little insulina" y "mini insulina" son entidades diferentes con características propias.

Caracterización cromatográfica de la "proinsulina" cristalizada de origen pancreático; Su relación con el componente "big insulina".

Una pequeña cantidad de "proinsulina" cristalizada de origen por-

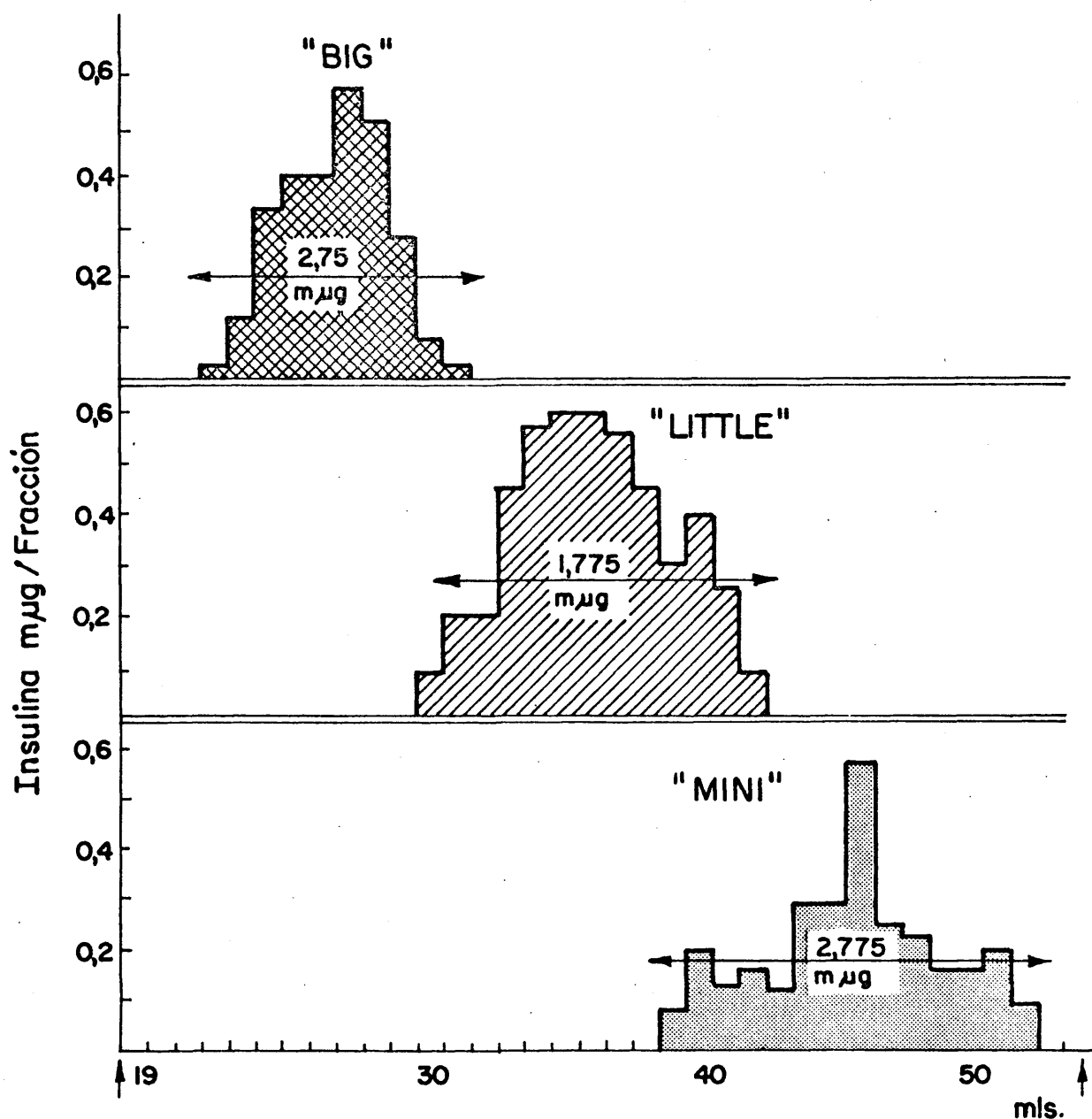


FIGURA 21.- Recromatografía de los componentes "big insulina", "little insulina" y "mini insulina", aislados del plasma del conejo.

1 ml de un concentrado libre de sales de cada uno de los tres componentes aislados, se filtró por una columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm).

En ordenadas damos los mμg de material inmunorreactivo recuperado/fracción. En abscisas se expresan el número de fracciones. Las flechas indican la salida de la albúmina y las sales.

Cada componente conserva su patron cromatográfico característico.

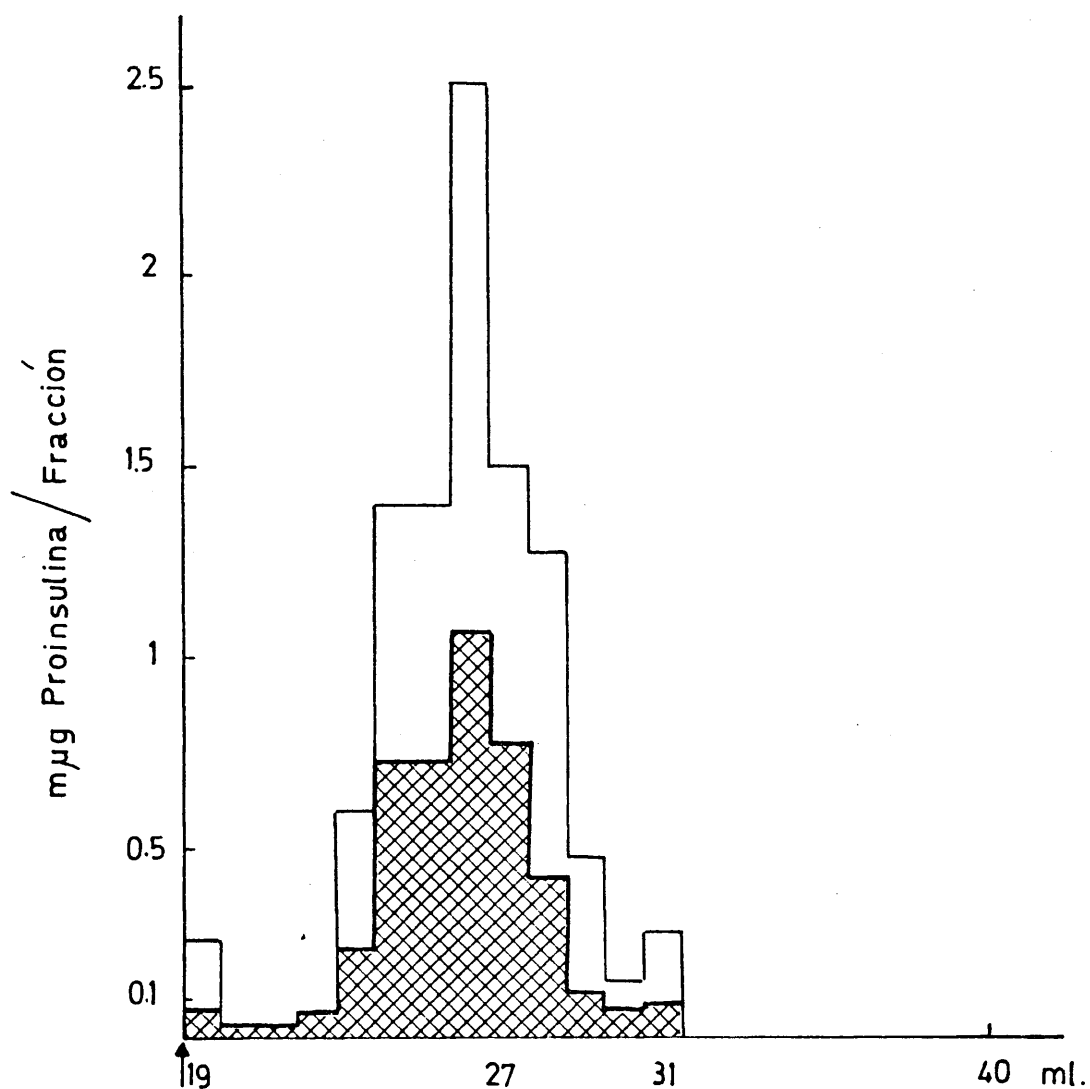


FIGURA 22.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de la "proinsulina" pancreática de origen porcino.

En ordenadas se expresan los mug de "proinsulina" recogida/fracción.

En abscisas representamos el número de fracciones. La flecha indica la localización de la albúmina plasmática.

La valoración inmunológica de las fracciones se realizó frente a un standard de insulina cristalizada de bovino. Recuperación de un 45 %.

La valoración inmunológica fué realizada frente a un standard de "proinsulina" cristalizada de porcino. La recuperación fué del 100 %.

El antisuero utilizado en ambos casos fué específico anti-insulina de porcino.

cino (Lote 615-1039B-220-C), obsequio del Dr D.E. Chance, de Lilly, U.S.A., se filtró por una columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm), de la manera habitual en este trabajo. Las fracciones obtenidas se valoraron radioinmunologicamente frente a dos standard, uno de "proinsulina" cristalizada de porcino, y otro de insulina cristalizada de origen bovino.

En la figura 22 queda expresada graficamente la posición en que eluye la "proinsulina"; su región es similar a la zona en que aparece el componente "big insulina". Esto nos hace sugerir, que existe una gran relación entre el componente aislado por nosotros en el plasma y la "proinsulina" de origen pancreático.

Por otra parte, tambien se observa la distinta cantidad de "proinsulina" recuperada, que corresponde a un 45 % cuando se valoró frente a un standard de insulina, y a un 100 % cuando se hizo frente a un standard de "proinsulina"

Caracterización cromatográfica del glucagón-I¹²⁵ utilizado como marcador.

"Mini insulina", el componente descrito por primera vez en este estudio, eluye en las columnas de sephadex G-50 en una región posterior a la "little insulina", entre esta y las sales plasmáticas. Con el fin de obtener el peso molecular aproximado de este componente, una pequeña cantidad de glucagón-I¹²⁵ de peso molecular conocido (aproxi-

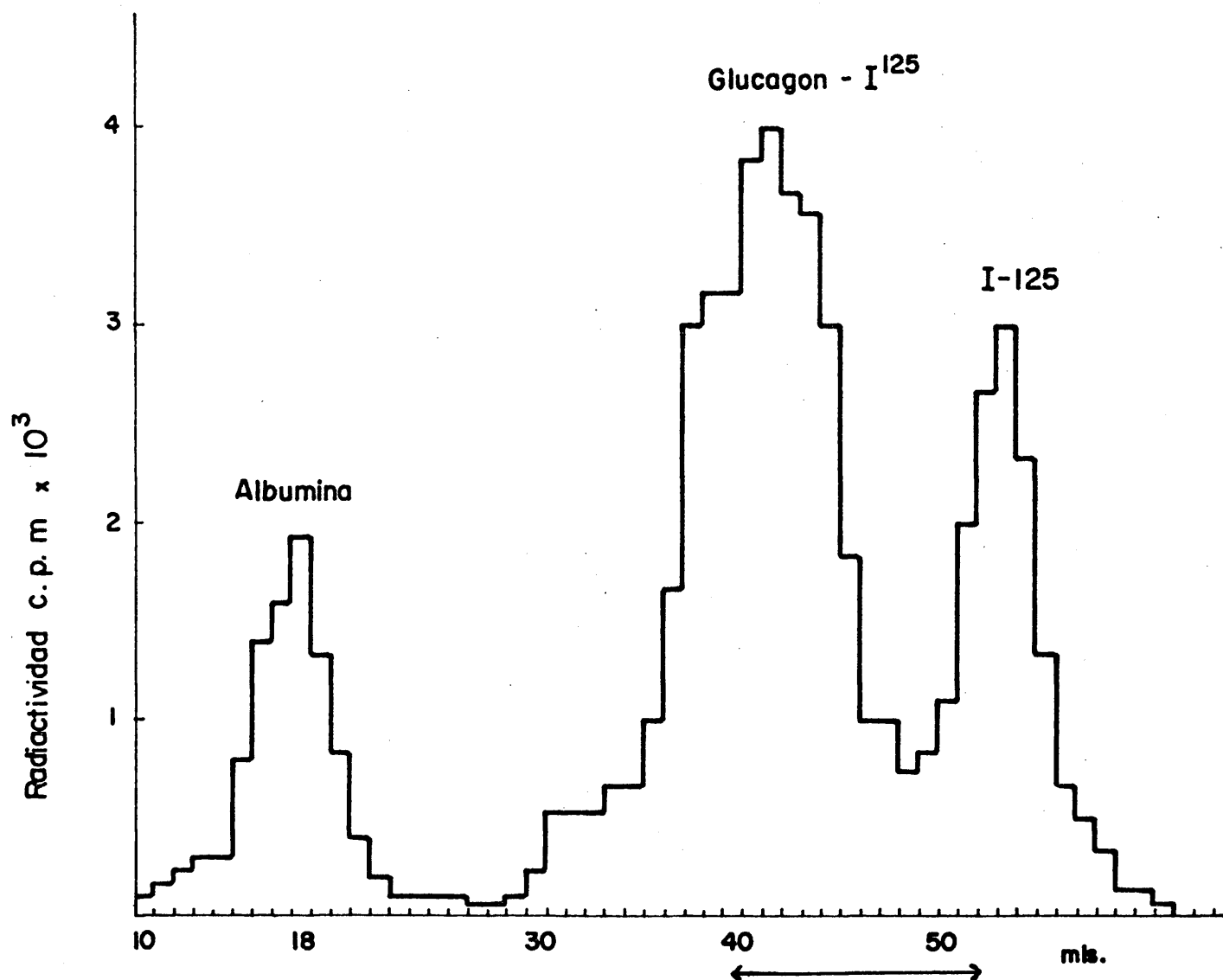


FIGURA 23.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino de una pequeña cantidad de glucagón-I¹²⁵.
La flecha situada debajo del eje de abscisas indica las fracciones en que eluye el componente "mini insulina".

madamente 3800) y obsequio generoso de la Dra. I. Valverde, se filtró por una columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm). Las fracciones de 1 ml colectadas, se valoraron midiendo su radioactividad en un contador de radiaciones Gamma, calibrado para I^{125} . En la figura 23 queda reflejado graficamente la zona en que eluye el glucagón- I^{125} , que corresponde aproximadamente a la posición en la cual aparece el componente "mini insulina".

Caracterización cromatográfica de la insulina cristalizada de origen pancreático: su relación con el componente "little insulina".

Una pequeña cantidad de insulina cristalizada de origen bovino (Lote BJ-4609) obsequio del Dr. D.E. Chance de Lilly U.S.A., se filtró por una columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) siguiendo las pautas del desarrollo técnico general. La figura 24 muestra las características cromatográficas de este material, donde se observa como el porcentaje mayor (94 a 96 %) eluye en una posición similar al componente "little insulina", y representa a la hormona verdadera de un peso molecular aproximadamente de 6000. Sin embargo, esta insulina comercial no es completamente pura, ya que contiene otros dos picos de material inmunorreactivo que corresponden a un 4 a 6 % de "big insulina" y un 2 a 4 % de "mini insulina".

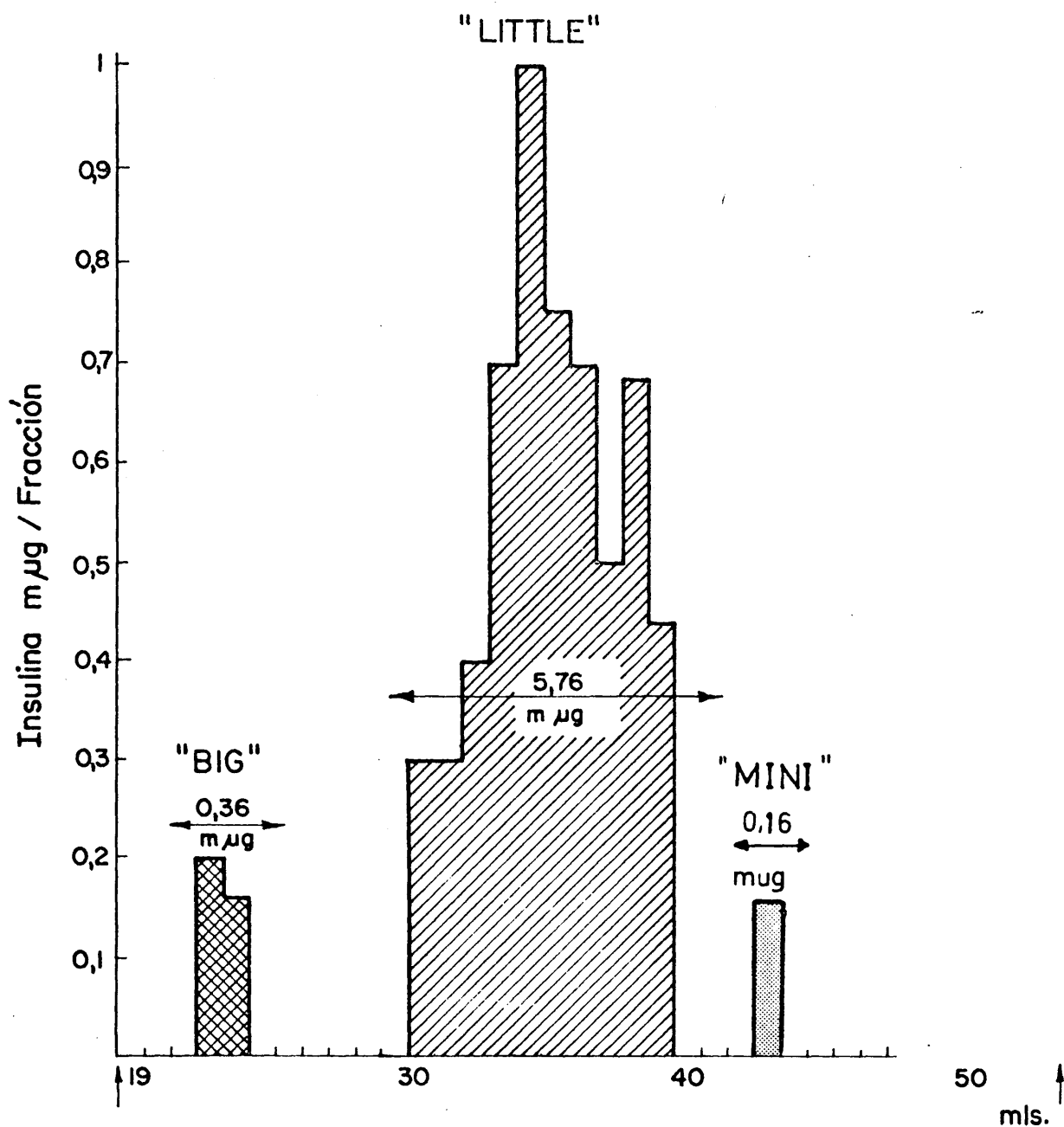


FIGURA 24.- Cromatografía en columna de sephadex G-50 fino (1 x 50 cm) de insulina pancreática de origen bovino. En ordenadas se expresan los m μ g de material inmunorreactivo recuperado por fracción. En abscisas representamos el número de fracciones. La valoración inmunológica se realizó frente a un antisuero específico anti-insulina de porcino (Lote K9223).

CARACTERIZACION INMUNOLOGICA.

Reacción inmunológica de los componentes "big insulina", "little insulina" y "mini insulina", con los antisueros específicos anti-insulina de porcino.

Múltiples alícuotas procedentes de los concentrados libres de sales obtenidos en el aislamiento de los tres componentes insulínicos, se valoraron radioinmunologicamente frente al antisuero anti-insulina de porcino (Lote K 9223), utilizado en este estudio.

En la figura 25, puede observarse el diferente grado de reacción inmunológica que presentan los tres componentes. Mientras que, el componente "little insulina" reacciona de una forma muy similar a la insulina de origen bovino utilizada como standard, los componentes "big insulina" y "mini insulina" reaccionan en un grado menor.

Reacción inmunológica de la "proinsulina" y "péptido C" cristalizados de origen pancreático, con los antisueros específicos anti-insulina.

Cuando valoramos inmunologicamente y en razón de su peso molecular, "proinsulina" pancreática de origen porcino, "péptido C" pancreático de origen porcino (Lote 615-1039-66E-A, secuencia 33 - 61), obsequio del Dr. D.E. Chance de Lilly U.S.A., e insulina pancreática de origen bovino, el grado de reacción que presentan estos productos frente al

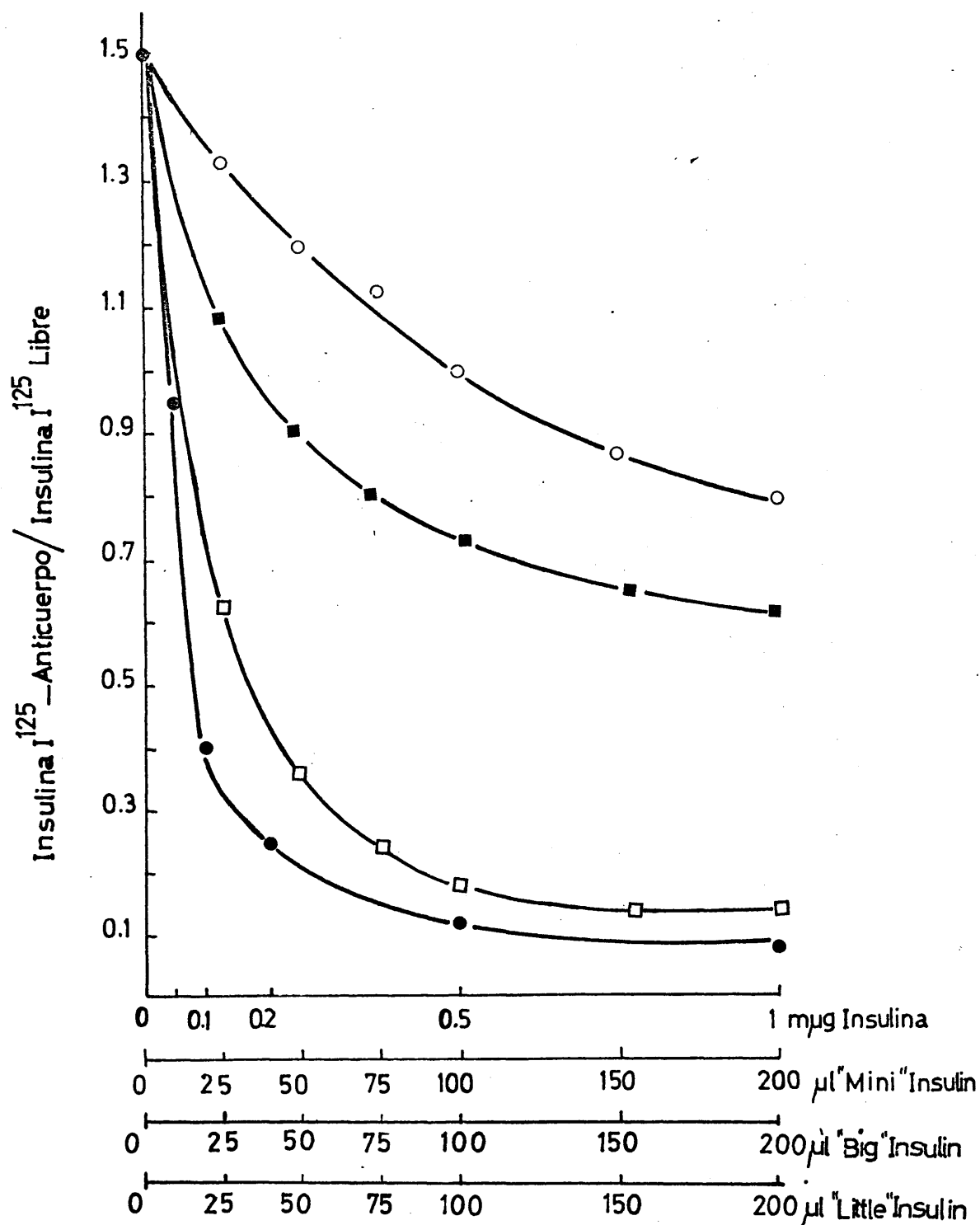


FIGURA 25.- Reacción inmunológica de "big insulina", "little insulina" y "mini insulina".

Múltiples alícuotas de cada uno de los componentes aislados del plasma se valoraron frente a una curva standard de insulina cristalizada de bovino. El antisuero utilizado es anti-insulina de porcino (Lote K 9223).

- Insulina cristalizada de bovino.
- "Big insulina"
- "Little insulina"
- "Mini insulina"

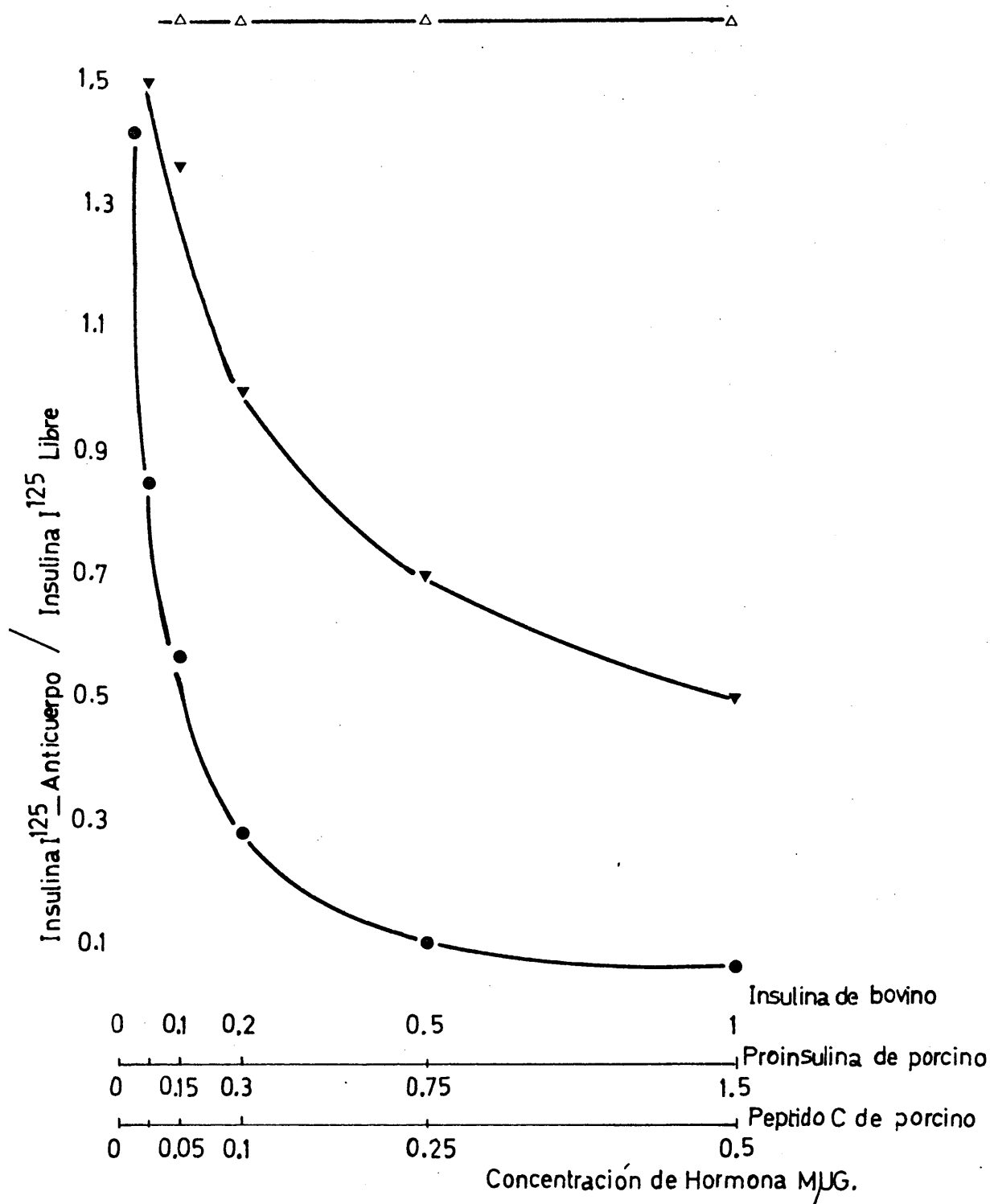


FIGURA 26.- Reacción inmunológica en razón de sus pesos moleculares de la "proinsulina" y "péptido C" pancreáticos de origen porcino, y de la insulina pancreática de origen bovino. El antisuero utilizado es específico anti-insulina de porcino (Lote K9223).

▼—▼—▼— "Proinsulina"
 △—△—△— "Péptido C"
 ●—●—●— Insulina.

antisuero específico anti-insulina de porcino, queda reflejado en la figura 26. La "proinsulina" reacciona aproximadamente un 45% al compararla con la reacción de la insulina, mientras que el "péptido C" permanece inerte, no mostrando ningún grado de reacción inmunológica con el antisuero anti-insulina.

DISCUSSION

Como ya he comentado ampliamente a lo largo de la exposición - de esta Tesis Doctoral, la idea fundamental que me guió a realizar este estudio, fue el poder aportar con los resultados alguna luz a uno de los problemas que ha tenido siempre el estudio de la fisiopatología de la secreción de insulina: el conocimiento de la naturaleza de la hormona circulante en sangre.

Si con el desarrollo del radioinmunoensayo poseíamos una técnica de gran sensibilidad capaz de detectar las muy bajas concentraciones de insulina en plasma, la introducción en los últimos años de los métodos de fraccionamiento proteico está proporcionando grandes avances en el campo de estudio de las hormonas polipeptídicas. Puede decirse, que la aplicación conjunta de ambas técnicas (radioinmunoensayo y fraccionamiento proteico) están abriendo nuevos conocimientos en el estudio de los factores patogénicos de la diabetes y otras alteraciones relacionadas con anormalidades es la producción y secreción de la insulina.

En nuestra introducción ya expusimos como poco tiempo después que Steiner en 1967 (94) demostrara la existencia de la "proinsulina" como precursor en la biosíntesis de la insulina, Rubenstein (102) e independientemente Roth (108) comunicaron la presencia de esta molé

cula en el plasma.

El hecho de que además de la insulina, en el plasma circulen - la "proinsulina" y otros componentes insulínicos, cuyo metabolismo hepático probablemente difiere del de la hormona verdadera, hace necesario realizar el estudio en la sangre de la vena porta.

El desarrollo de una sencilla técnica quirúrgica consistente en la canulación de una rama de la vena porta, nos ha permitido obtener un cómodo sistema experimental para poder estudiar no sólo los aspectos cuantitativos, sino también las propiedades cualitativas de la hormona directamente secretada por las células β del páncreas.

Nuestros resultados indican claramente, que en el plasma portal del conejo existen, al menos, tres componentes que reaccionan inmunológicamente como la insulina: "Big insulina", "Little insulina" y "Mini insulina".

En efecto, al filtrar el plasma por columnas de sephadex G-50, la insulina endógena valorada por el radioinmunoensayo como componente único, aparece separada en tres fracciones ó componentes que reacionan con los antisueros específicos anti-insulina.

La fracción mayor, aparece como un pico simétrico en una región intermedia entre los picos de elución de las proteínas de alto peso molecular (albúmina- I^{125}) y las sales plasmáticas (I^{125}). Esta región corresponde a la zona en que eluye la insulina- I^{125} (insulina

cristalizada de un peso molecular de aproximadamente 6000).

Una segunda fracción, de mayor peso molecular, es por tanto menos retenida por el sephadex y eluye en una región anterior al pico de la insulina- I^{125} , entre ésta y el pico de las seroproteínas. Por su posición corresponde a la zona en que eluye la proinsulina cristalizada, de peso molecular aproximadamente 9000.

Ambos componentes ó fracciones tienen características cromatográficas semejantes a los componentes descritos por Roth y col. - (108) en el plasma humano con los nombres de "Little insulin" y "Big insulin", respectivamente.

Existe además un tercer componente, que por ser más retenido - por el gel, eluye en una zona posterior a la insulina cristalizada (insulina- I^{125}) entre esta y el pico de las sales plasmáticas. Este componente descrito por primera vez en esta tesis doctoral ha recibido tentativamente el nombre de "Mini insulina".

Entre las diferentes cuestiones que este hallazgo nos plantea, vamos a considerar en primer lugar la posible identidad de los tres componentes circulantes.

Debido a que la insulina y componentes insulínicos circulan en sangre a muy bajas concentraciones, es completamente imposible su - caracterización directa. Ello equivaldría a estudiar la estructura

primaria ó secuencia de aminoácidos de cada uno de los componentes, a partir del material extraído del plasma. Hasta la fecha y a pesar del gran avance conseguido en las técnicas para el fraccionamiento de proteínas, no se ha logrado obtener material a partir del plasma en condiciones de gran pureza y en cantidad suficiente para permitir estos trabajos. Por esta razón, todos los estudios se han realizado comparando las características de los componentes insulínicos del plasma con la insulina y componentes insulínicos de origen pancreático.

Por nuestra parte, al no disponer de insulina y "proinsulina" cristalizadas puras de conejo, este estudio ha quedado limitado a la comparación de las características cromatográficas e inmunológicas de los componentes aislados en el plasma del conejo con la insulina cristalizada de bovino y la "proinsulina" y "peptido C" cristalizados de origen porcino. El Dr. R. E. Chance de Elly Lilly Research Laboratories de U.S.A. tuvo la gentileza de enviarnos estos productos para la realización del estudio.

El componente "big insulina", por sus características cromatográficas y por su capacidad para reaccionar con los anticuerpos específicos anti-insulina, representa el componente de igual nombre descrito por Roth en humanos (108).

Su zona de elución en nuestras columnas de sephadex G-50 corres

ponde a la región en que eluye la "proinsulina" cristalizada de porcino (fig. 22), por lo que podemos concluir de acuerdo con Roth, - que el componente "big insulina" contiene al precursor biosintético de la insulina.

Por sus resultados, Gorden y col. (175), Lazarus y col. (109) y Melani y col. (176) llegan a la misma conclusión, admitiendo que el componente "big insulina" no es una sustancia única sino que representa un material heterogeneo formado por varios componentes que incluyen a la "proinsulina" y/o sus "formas intermedias". Estas consideraciones nos permiten sugerir, que la "big insulina" que hemos aislado corresponde al "pico b" que Steiner y Oyer (94) aislaron en la insulina comercial (ver pag. 180).

Como la "proinsulina" y las llamadas "formas intermedias" ("componentes proinsulinicos") muestran distinta capacidad inmunológica frente a los antisueros específicos anti-insulina, la mezcla en el plasma de estas diferentes proteínas en cantidades relativamente variables según las circunstancias, hace que el componente "big insulina" presente diferentes grados de reacción con los anticuerpos - anti-insulina, reacción que va del 25 al 100% (175).

Hasta la fecha, para el estudio de los diferentes componentes insulínicos en el plasma, la única técnica de fraccionamiento que podemos utilizar es la cromatografía, bien en geles de sephadex ó bien

en biogeles. Ninguno de los dos procedimientos es capaz de separar la "proinsulina" de sus "formas intermedias", por lo que aparecen - como un componente único; por tanto mientras no se disponga de otras técnicas capaces de separar e identificar estas diferentes proteínas en el plasma, este material seguirá recibiendo el nombre de "big in sulina" ó de "CPL" ("componente análogo a la proinsulina") (175).

El procedimiento seguido por Roth (108) en el aislamiento del componente "big insulina" difiere del empleado por Rubenstein y col. (102) y Melani y col. (176) en el estudio e identificación del compo nente "CPL" del plasma. No obstante las analogías de ambos componen tes no sólo se basan en el orden de sus pesos moleculares y reacción inmunológica frente a los antisueros específicos anti-insulina, sino que ademas muestran una sensibilidad a la tripsina muy similar.

Una de las características más significativas de la "proinsuli na" es, que por la acción de la tripsina se convierte en insulina. Gorden y col. (175) y posteriormente Sherman y col. (177) empleando dicho procedimiento, han sido capaces de convertir "big insulina" - aislada del plasma humano y empleando como marcador "proinsulina-I¹²⁵ en un material con características cromatográficas semejantes a la "little insulina". Por su parte, Melani y col. (176) demuestran que la digestión tripsica de la fracción "CPL" (componente proinsulinico) del suero humano, aumente la capacidad inmunológica de este material

frente a los antisueros anti-insulina. La exposición de "CPL" a gran des concentraciones de tripsina, lo convierte en un material con ca racterísticas semejantes a la insulina y al "Desoctapeptido insulina". Según esto y aunque parece bastante probable que nuestra "big insulina" corresponde también al "CPL" circulante en el plasma, planeamos para un futuro próximo y dentro de nuestra línea experimental, estu diar el comportamiento que sigue dicho componente "big insulina" al exponerlo a la acción de diferentes concentraciones de tripsina.

En nuestro sistema experimental, el antisuero anti-insulina de porcino que hemos utilizado tiene una capacidad de reacción con la "proinsulina" cristalizada de origen porcino de un 45% aproximadamente (fig. 22,26). Resultados análogos ha obtenido el Dr. Chance en su laboratorio (comunicación personal).

A su vez, el componente "big insulina" aislado del plasma de co nejo y la proinsulina cristalizada de porcino muestran alguna diferencia en su capacidad de reacción con el antisuero (figs. 25,26). Este hecho refleja posiblemente la diferente composición de aminoácidos entre los segmentos conectantes ("peptido C") de la "proinsulina" de conejo y del cerdo.

Steiner y col. (97) han determinado parcialmente la secuencia de aminoácidos de la "proinsulina" de bovino, y Chance y col. (101) la completa secuencia de aminoácidos de la "proinsulina" de origen

porcino. En contraste con las cadenas A y B de la hormona, donde la mayor parte de las insulinas de mamífero solamente difieren en unos pocos aminoácidos, los "peptidos C" de las "proinsulinas" de origen bovino y porcino difieren en la mitad de sus aminoácidos, teniendo la última 5 aminoácidos más que la "proinsulina" de bovino. Estas - diferencias quedan reflejadas en la diferente reacción inmunológica de ambas proinsulinas frente a un antisuero específico anti-proinsulina de porcino (102). Como consecuencia, el estudio de la "proinsulina" en una especie animal determinada y en el hombre, requiere, - el disponer de "proinsulina" pura de la misma especie así como anti sueros específicos. Los sistemas de reacción cruzada no son exactos y por tanto los resultados obtenidos son relativos y solamente expresan una idea aproximada de la concentración de esta molécula en el plasma.

"Little insulina", en nuestro sistema experimental se comporta cromatografica e inmunológicamente de manera semejante a la insulina cristalizada de bovino (fig. 24). Estos resultados están totalmente de acuerdo con las conclusiones de Roth y col. (108), Gorden y col. (175), Melani y col. (176) y Goldsmith y col. (178), entre otros, indicando que el componente "little insulina" representa a la hormona verdadera y/o insulina ligeramente modificada, pero cuyas actividades

biológica e inmunológica corresponde aproximadamente a 24 U/mg (97)

Resultados muy recientes de Sherman y col. (177) utilizando células grasas aisladas demuestran, que mientras la actividad biológica de "little insulina" es idéntica a la de la insulina cristalizada de porcino, el componente "big insulina" posee menor actividad biológica y por otra parte ésta actividad corresponde a la que presenta la "proinsulina" cristalizada de porcino.

El componente "mini insulina" desde el punto de vista de sus características cromatográficas (zona de elución en las columnas de sephadex G-50), hemos visto que correspondería a un material cuyo peso molecular, algo inferior al del glucagón- I^{125} sería aproximadamente de 3000 a 3500 (fig. 23). Ahora bien, si el peso molecular de una sustancia es una de las características que más pueden influir en la separación molecular por este tipo de geles, no podemos excluir otras diferencias tales como mayor ó menor asimetría de la molécula y que pueden ser la causa de la mayor retención de la sustancia por el sephadex.

Por si sólo, este dato nos haría sospechar que este componente podría corresponder al "peptido C" ó peptido de conexión de la molécula de "proinsulina", maxime cuando se ha descrito muy recientemente que este peptido circula libremente en la sangre de humanos (179)

No obstante, parece poco probable que este nuevo componente corresponda al mencionado "peptido C". Recientes resultados (180) pruebaban que en cuanto a esta molecula se refiere, por lo menos en el cerdo, bovino y humano, no existe reacci3n con los respectivos antisueros anti-insulina. Por otra parte, debido probablemente a las diferencias considerables en sus estructuras, no existe reacci3n cruzada entre dichos peptidos de conexi3n y los antisueros "anti-proinsulina" 6 "anti-peptido C" pertenecientes a las otras especies, por esto los antisueros usados en la determinaci3n del "peptido C" tienen que ser espec3ficos para cada especie.(103).

En nuestro sistema, los antisueros que hemos utilizado son de origen comercial y provienen de los Laboratorios Wellcome, siendo - antisueros anti-insulina de cerdo. Para que estos antisueros puedan valorar el "peptido C" de conejo, tendr3an logicamente que detectar el "peptido C" de origen porcino, y en caso afirmativo significar3a que la estructura qu3mica de los peptidos de conexi3n de la mol3cula de "proinsulina" en el cerdo y el conejo ser3an semejantes, por lo menos en los grupos antig3nicos de sus estructuras.

Los resultados que hemos obtenido expresan claramente que no - existe reacci3n inmunol3gica entre el "peptido C" cristalizado del cerdo y los antisueros anti-insulina de cerdo que hemos utilizado en nuestras valoraciones (fig. 26). En nuestro sistema experimental

no hay pues posibilidad de valorar el "peptido C" del conejo.

Por otra parte, tambien hay evidencia de que el "peptido C" eluye en la misma posición que la insulina en las cromatografías en sephadex G-50 y en biogel, aunque se puede separar facilmente de la - hormona por electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 8,9 y en papel en 30% de ácido fórmico, (104, 179).

Con el desarrollo de un inmunoensayo específico para el "peptido C", Melani y col. (104) han valorado esta molecula en el suero de humanos. Las concentraciones de esta molécula en sangre son equimolares a las de la insulina, sugiriendo que estas sustancias se almacenan juntas en los granulos de secreción de las células β , y son - secretadas en cantidades equimolares principalmente durante el proceso de emiocitosis de dichos gránulos. Estos datos difieren considerablemente de nuestros resultados, ya que el componente "mini insulina" cuyas fluctuaciones en sangre analizaremos posteriormente, no se encuentra en concentraciones equimolares con la "little insulina".

Por su capacidad para reaccionar con los antisuéros específicos anti-insulina, aunque en menor grado que la insulina cristalizada de bovino (fig. 25), el componente "mini insulina" nos hace sospechar que en su molécula está contenida una gran parte de la estructura - intacta de la insulina. Sabemos que los antisueros específicos anti-insulina de bovino y porcino solamente tienen capacidad de reaccio-

nar con sustancias cuya estructura es muy similar a las formas intactas de las respectivas insulinas de bovino y porcino (181,86). Las insulinas de pez y cobaya, que si bien tienen la configuración general de las insulinas de mamífero, su composición en aminoácidos difiere grandemente, no reaccionan o lo hacen en menor grado (86-182). De igual manera, la cadena A aislada que conserva intacto un puente disulfuro puede reaccionar debilmente, mientras que las cadenas A y B aisladas y reducidas son inertes (181). Por último, el desoctapeptido insulina (insulina que ha perdido los 8 aminoácidos terminales de la cadena B), conserva casi completa su capacidad antigénica, pero posee muy poca ó ninguna actividad biológica (46).

Otra posibilidad a considerar es que, este nuevo componente detectado en el plasma portal del conejo, fuese un artefacto del sistema experimental utilizado. Con este fin realizamos una serie de experimentos control que en todos los casos dieron resultados negativos (ver pág. 100 y fig. 14).

Por último es importante recordar que en las recromatografías los tres componentes inmunorreactivos (figs. 20,21) conservan su patrón cromatográfico característico y permanecen libres de los otros componentes, indicando con ello que, "big insulina", "little insulina" y "mini insulina", son entidades independientes y con características propias.

De un interes muy particular es el hecho de que "mini insulina" se detecte en la insulina cristalina de origen comercial. Si bien el 94 a 96% de la hormona corresponde a proteina que eluye en la zona de "little insulina", existe un 4 a 6% que se encuentra en la región correspondiente a la "big insulina", y un 2 a 4% que aparece en la zona de la "mini insulina" (Fig. 24). Estos datos indican que, "mini insulina" es un componente normal en algunas preparaciones comerciales de la hormona, juntamente con la "proinsulina", y apoyaría una vez más la idea de que el componente "mini insulina" no corresponde al "peptido C" ya que dicho peptido no está presente en la insulina - cristalizada.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Steiner y Oyer (94, 97) y posteriormente por Chance y col. (101) vemos que existe una ligera diferencia. Ambos investigadores no han detectado el componente "mini insulina" en sus análisis. Sus estudios indican que cuando la insulina comercial se filtra por sephadex G-50 en ácido acético 1 M, el 97 a 98% de la proteina se recoge en la región - correspondiente a la insulina (pico c"), conteniendo insulina pura ó insulina que ha sufrido ligeras modificaciones (deamidación), y - cuyas actividades biológicas e inmunológicas es aproximadamente de 24 U/mg (97). El resto del material, que representa un 2 a 3%, eluye en una zona intermedia entre el pico de la insulina verdadera y

el volumen vacío ("pico b"). El material del "pico b" tiene una actividad biológica de aproximadamente 5 U/mg y una capacidad inmunológica de 8 a 15 U/mg (97). A su vez, el fraccionamiento de las proteínas del "pico b" por electroforesis en geles de poliacrilamida ó por cromatografía en DEAE-celulosa, separa tres componentes mayores y varios menores; los primeros parecen ser los más importantes y están representados por la "proinsulina", la "forma intermedia" y la "forma no convertible". Las tres fracciones proteicas reaccionan inmunológicamente con los antisueros anti-insulina; pero en contraste a las dos primeras, la "forma no convertible" no es sensible a la acción de la tripsina, por lo cual se sugiere que representa un dímero de la insulina cuya estructura no se conoce bien. Los componentes menores no están caracterizados, aunque parece ser que representan formas deamidadas de los componentes mayores.

Aunque no podemos saber con certeza a que se deben las diferencias existentes entre los resultados de los investigadores mencionados y los datos obtenidos por nosotros, parece muy posible que el grado de pureza de las distintas preparaciones comerciales de la hormona, ó bien la diferente potencialidad de un determinado antisuero frente a los componentes "big insulina" y "mini insulina" pueda ser la causa de estas diferencias.

Sobre este último punto, nosotros hemos podido observar, como

el empleo de diferentes lotes de antisueros influye enormemente en los porcentajes que hemos obtenido de dichos componentes. Por esta causa, todo este trabajo ha sido realizado utilizando un único lote de antisueros.

Una vez caracterizados los tres componentes "big insulina", "little insulina" y "mini insulina" circulantes en el plasma, otro punto de gran interes, es analizar el comportamiento que siguen dichos componentes insulínicos en las distintas situaciones experimentales que hemos estudiado, y en las que hasta la fecha no se había tenido en cuenta la presencia en sangre de otras proteínas diferentes de la verdadera insulina, pero capaces de reaccionar con los antisueros - específicos anti-insulina y por tanto valorables por las técnicas - rutinarias del inmunoensayo.

Los experimentos realizados en los animales del grupo control, nos indican claramente la existencia en el plasma portal de los tres componentes descritos (fig.8).

La concentración total de insulina circulante en condiciones ba sales de ayuno de 24 horas, representa un valor medio de 1.238 $\mu\text{g/ml}$ de plasma ($\text{DE} \pm 0.16$). Tabla I

La mayor parte de la hormona circulante corresponde a "little

insulina", cuyos porcentajes son del 86 al 94%. El componente "big insulina" representa solamente de un 2 a 11% de la concentración total de insulina. Por los distintos estudios realizados parece ser que la "proinsulina" corresponde a menos del 5% (de un 1 a 2%) del contenido total de insulina en el páncreas normal. Nuestros valores sugieren por tanto, que en condiciones basales, aunque una pequeña fracción de la insulina inmunorreactiva circulante podría representar hormona sintetizada "de novo", la mayor parte corresponde a hormona almacenada en los gránulos de las células β del páncreas.

Sin embargo, los resultados obtenidos independientemente por Melani y col. (176), y Gorden y col. (183) en el plasma de personas en ayuno, muestran cifras de "big insulina" que oscilan entre 5 y 48% de la insulina total. Esto significaría que en estas condiciones, una gran parte de la hormona circulante corresponde a insulina recién sintetizada. Es poco claro el significado que en condiciones basales pueden tener estos altos valores de "proinsulina" circulante, y este es un punto de gran interés en estudios posteriores.

En cuanto al componente "mini insulina", si bien está presente en las condiciones basales de no estímulo, sus porcentajes que oscilan entre un 2 a 4% de la hormona total circulante, corresponden a una cantidad mínima de material inmunorreactivo. No obstante, su presencia parece indicar que esta molécula es un componente normal de

las células β del páncreas y que se vierte a la circulación juntamente con la insulina y "proinsulina"

En los animales en ayuno de 48 horas, tenemos una situación experimental de gran interes ya que el ayuno prolongado es una situación metabolica que afecta profundamente a las células β del páncreas. Se caracteriza por una disminución en la secreción de insulina y por una intolerancia a la sobrecarga de glucosa, denominada "diabetes del ayuno" (184, 185).

Lo primero que se deduce de nuestros resultados, es que el ayuno de 48 horas por sí sólo, no altera el patrón general de los componentes insulino inmunorreactivos del plasma. En estas condiciones, el porcentaje mayor de hormona circulante corresponde a "little insulina" con un valor de 88 a 98% de la insulina total. (fig. 9). Frente a esto, hay que señalar una disminución en la concentración absoluta de insulina circulante, que es estadísticamente significativa al compararla al grupo basal ($p < 0.001$), y que se acompañó de una disminución también estadísticamente significativa ($p < 0.01$) de la concentración de glucosa en sangre. Tabla II

Los cambios paralelos de los niveles de glucosa e insulina circulantes indican la existencia de un sistema metabólico finamente regulado, donde la insulina puede estar representando un importante

papel. Esta insulina corresponde a "little insulina" u hormona que consideramos inmunológica y biológicamente activa.

En nuestras condiciones experimentales, parece bastante claro que, tanto en el ayuno prolongado como en situación basal, la presencia en el plasma de los componentes "big insulina" y "mini insulina", no pueden alterar significativamente los valores de insulina - total aportados por las técnicas inmunológicas de rutina. Los datos obtenidos indican, que la insulina total del plasma valorada por el radioinmunoensayo, en estos casos se aproxima bastante a las concentraciones de "little insulina" (Tablas I y II). No obstante, no hay que olvidar el importante papel que tienen los antisueros específicos anti-insulina utilizados en estas determinaciones. La mayor ó menor capacidad de reacción de estos antisueros (que como ya he dicho depende del lote utilizado), con los componentes "big insulina" y "mini insulina", puede influir grandemente en los resultados obtenidos.

Después de la administración de glucagón a conejos en ayuno previo de 24 horas, la concentración total de insulina en el plasma por tal se elevó considerablemente ($p < 0.0001$). Al mismo tiempo, no observamos ninguna alteración en los niveles glucémicos, que mostraron valores análogos a los observados en los animales no estimulados - (P No significativa).

Foa y col. (186) en 1952, consideran que el efecto del glucagón sobre la secreción de insulina es secundario a la elevación de la - glucosa en sangre.

Candela en 1961, fue uno de los primeros investigadores que observó el efecto del glucagón en la secreción de insulina por el páncreas de pato incubado "in vitro" (115).

Posteriormente, Samols y col. (171) demuestran que la inyección intravenosa de glucagón pancreático estimula la secreción de insulina, independientemente de su efecto sobre la concentración de glucosa en sangre. Aunque este efecto del glucagón se estudió primeramente en humanos empleando dosis farmacológicas muy elevadas, posteriormente gran número de investigadores han demostrado su efecto en gran variedad de especies animales tanto "in vitro" como "in vivo" (116, 187 - 188 - 189 - 190 - 191 - 192), y a concentraciones que corresponden a los niveles fisiológicos (146 - 190 - 191). Puesto que nuestros resultados muestran niveles altos de insulina junto a glucemia normal en animales tratados con glucagón, de acuerdo con lo propuesto por Samols y col. (171), podemos sugerir que el glucagón estimula la secreción de insulina directamente, y su efecto es anterior e independiente de los cambios glucémicos.

Los datos obtenidos demuestran que en respuesta al glucagón hay una elevación en los niveles de "big insulina", "little insulina" y

"mini insulina" circulantes. No obstante, como los valores elevados de los tres componentes coexisten con la elevación en la concentración total de hormona en sangre, las proporciones relativas de estos son análogas a las observadas en los animales control, no siendo sus diferencias estadísticamente significativas (fig. 10). El porcentaje mayor de hormona circulante corresponde pues, al componente "little insulina", que comprende un 88 a 93 %, lo cual demuestra como el glucagón estimula principalmente la insulina almacenada en los gránulos de las células β del páncreas.

En contraste al glucagón, la estimulación con tolbutamida dió lugar en nuestros animales, a una elevación en la concentración total de insulina circulante ($p < 0.0001$), que se acompañó de una disminución también estadísticamente significativa ($p < 0.005$) en los niveles de glucosa en sangre.

En estas condiciones experimentales, hay una elevación cuantitativa de los tres componentes inmunorreactivos del plasma. Sin embargo sus porcentajes demuestran, frente a una elevación significativa ($p < 0.005$) del componente "big insulina", una disminución proporcional ($p < 0.005$) del componente "little insulina", y una ligera elevación ($p < 0.02$) del tercer componente, fig. 11 .

Estos resultados sugieren que la tolbutamida estimula la secre-

ción de insulina de manera diferente a la observada por el glucagón. La droga hipoglucémica no sólo actúa a nivel de los gránulos de las células β , estimulando la secreción de proteína almacenada, sino - que una parte de la hormona secretada corresponde a insulina recién sintetizada.

Nuestros resultados son muy similares a los obtenidos por Gorden y Roth (192), quienes encuentran que la elevación en el porcentaje de "big insulina" como respuesta a la inyección de arginina y tolbutamida, está en dependencia directa del tiempo transcurrido desde la aplicación del estímulo.

Por su parte, Lazarus y col. (109) y Melani y col. (193), han demostrado recientemente en pacientes con insulinomas, que en respuesta a la administración de tolbutamida un 50% de la insulina circulante corresponde a "big insulina". Resultados similares han obtenido Goldsmith y col. (178).

El estudio realizado con las hormonas gastrointestinales secretina y pancreocimina, cuyos efectos sobre la secreción de insulina comentamos extensamente en el planteamiento de esta Tesis Doctoral, nos han proporcionado resultados altamente interesantes.

Después de la administración intravenosa de secretina pura, los niveles de insulina en sangre portal se elevaron rápida y considerada

blemente, siendo esta elevación estadísticamente muy significativa ($p < 0.0001$), tanto en el ayuno previo de 24 horas como en el ayuno prolongado de 48 horas. No existen diferencias apreciables en la concentración total de hormona circulante entre los dos grupos experimentales estudiados (p no significativa).

Sin embargo, los altos valores de insulina circulante no se acompañaron de las alteraciones glucémicas que cabría esperar; no hay diferencias entre las glucemias en estos animales y las observadas en su respectivo grupo control (p no significativa).

Estos resultados están totalmente de acuerdo y confirman una vez más, las diferentes observaciones aportadas a la literatura mundial. Unger y col (142) en el perro, y más recientemente Chisholm y col. (172) y Lerner y col. (173) en el hombre, demuestran como la secreta estimula la secreción de insulina de una manera rápida, intensa y pasajera. El pico de secreción máxima de la hormona aparece de uno a dos minutos después de aplicado el estímulo, retornando a sus valores basales dentro de los diez a quince minutos siguientes.

Teniendo en cuenta que el tiempo de circulación venosa de la secreta, desde el punto de su aplicación en la periferia hasta las células β del páncreas es aproximadamente de uno a dos minutos, la respuesta de los islotes a este estímulo es análoga a la originada por la estimulación con glucosa intravenosa. Esto sugiere que la hor-

mona gastrointestinal estimula un pool de insulina almacenada, que está dispuesta para su rápida secreción.

La falta de respuesta hipoglucémica observada en todos los estudios realizados, y confirmada en nuestros resultados, no ha tenido hasta ahora una explicación segura.

Entre las distintas posibilidades que los científicos interesados en este problema admiten, podemos destacar las siguientes:

- I.- La existencia de factores compensatorios que previenen la hipoglucemia.
 - 2.- Que la elevación de los niveles de insulina circulante no corresponden a hormona biológicamente activa, aunque si con capacidad inmunológica frente a los antisueros anti-insulina.
 - 3.- Que la secretina puede alterar de alguna manera la extracción hepática de la insulina.
 - 4.- Que la secretina puede estimular al mismo tiempo la secreción de insulina y la movilización del glucógeno almacenado en el hígado.
- Estas propiedades son características del glucagón, y su posibilidad se ha sugerido teniendo en cuenta la analogía existente en la estructura química de ambas moléculas, así como la común propiedad de las dos hormonas de ser lipolíticas "in vitro" (194).

Es muy difícil precisar con exactitud cual pueda ser la causa de esta falta de respuesta hipoglucémica. No obstante, los resulta-

dos que hemos obtenido son de gran interes y creemos pueden aportar alguna explicación al problema planteado.

Las características cromatográficas de la insulina circulante muestran un patron que difiere grandemente del patrón general encontrado como respuesta a los otros estímulos estudiados.

A pesar de observarse una elevación en los niveles cuantitativos de los tres componentes insulínicos, cuando sus valores se expresan como porcentajes de los niveles de insulina total en plasma, se aprecia una marcada elevación del componente "mini insulina", cuyos porcentajes llegan a representar en algunos animales mas del 50% de la hormona total circulante ($p < 0.001$). Frente a esto se observa una disminución proporcional ($p < 0.001$) del componente "little insulina" y no aparecen cambios importantes en el componente "big insulina" (p no significativa). fig. 12.

El ayuno de 48 horas no influyó para nada en los valores porcentuales de "mini insulina" que siguen siendo estadísticamente muy elevados ($p < 0.001$). Sí se observa un aumento del componente "big insulina" ($p < 0.001$) y un descenso mayor en el porcentaje de "little insulina" ($p < 0.001$); cabe pensar pues, que al prolongar el tiempo de ayuno hay una disminución en la formación de insulina a partir de la "proinsulina" (fig. 13).

Como respuesta a la estimulación con pancreocimina y confirmando estudios previos, nuestros resultados muestran en ambos grupos experimentales (ayuno previo de 24 y 48 horas, respectivamente), una elevación rápida e intensa en los niveles de insulina total en sangre, ($p < 0.005$). Aunque aparentemente se observa alguna diferencia entre los valores absolutos de hormona circulante entre los dos grupos experimentales, estas diferencias no son estadísticamente significativas (p no significativa).

Si bien las dosis de pancreocimina utilizadas en este estudio son bastante elevadas, Meade y col. (195) han obtenido una respuesta similar en la concentración de insulina en sangre, empleando el estímulo en concentraciones menores.

La falta de respuesta hipoglucémica que hemos observado, es una confirmación de los resultados obtenidos por un grán número de investigadores, en respuesta a la estimulación con las hormonas intestinales.

Elevación en los niveles de insulina circulante, sin alteraciones en la glucemia se han observado tambien despues de la administración de ácidos grasos (196), tetragastrina (195) y xilitol (197).

Por otra parte, Meade y col.(195) advierten despues de la estimulación con pancreocimina, una disminución de los FFA circulantes sin cambios apreciables en los niveles glucémicos. A su vez, Zierler y Rabinowitz (198) demuestran que la infusión de $10 \mu\text{U/ minuto}$ de in-

sulina, dá lugar a una disminución de los FFA sin ningún efecto sobre la captación de glucosa.

Estudios "in vitro" sobre diafragma de rata, indican que la pancreocimina por sí misma, no posee ningún efecto inhibitor (195).

Hasta ahora, pues, es muy difícil llegar a ninguna explicación concluyente. Meade y col. (195) sugieren que la disociación entre la insulina y glucosa que aparece como respuesta a la pancreocimina, podría ser debida a la secreción de hormona biológicamente inactiva.

Nuestros resultados no parecen apoyar la hipótesis de Meade, ya que si en los animales en ayuno previo de 24 horas observamos una elevación estadísticamente significativa ($p < 0.001$) del componente "mini insulina", este componente aparece completamente normal, en los animales sometidos a un ayuno prolongado de 48 horas (p no significativa). Tampoco el componente "big insulina" presenta porcentajes elevados en ninguno de los dos grupos (p no significativa), si bien aparentemente aparece un poco mas elevado en los animales del segundo grupo. Parece poca probable que cualquiera de estos dos componentes "big insulina" ó "mini insulina", sea el responsable de la falta de hipoglucemia que sigue a la administración de pancreocimina. Cabe pensar, que en respuesta a la estimulación con pancreocimina la insulina circulante corresponde en su mayor parte a "little insulina", es decir, a hormona que consideramos biológica e inmunológicamente activa

(fig. 15 y 16).

Estudios de Unger y col. (142) en perros señalan que la pancreocimina estimula la secreción de glucagón, que a su vez eleva los niveles glucémicos, compensando de esta manera la acción de la insulina sobre la glucemia lo que en esta situación experimental sería la explicación mas aceptable.

De estos datos podemos señalar que, tanto la secretina como la pancreocimina estimulan principalmente la hormona almacenada en los gránulos de las células β del páncreas. El mecanismo que regula esta secreción es desconocido, aunque sí parece bastante seguro que los dos estímulos actúan de manera diferente, mientras que la mayor parte de insulina circulante, como respuesta a la pancreocimina, corresponde a "little insulina"; después de la estimulación con secretina el mayor porcentaje de hormona en sangre aparece como "mini insulina".

La importancia fisiológica de este nuevo componente depende en gran parte de su naturaleza y actividad biológica. Hasta la fecha, este es un punto completamente desconocido, por lo que no podemos -- llegar a ninguna conclusión. Bien pudiera tratarse de un producto -- derivado de la insulina ó una insulina modificada, que conservando su capacidad inmunológica no favorece la utilización de la glucosa por los tejidos periféricos, aunque puede actuar a otros niveles -- del metabolismo intermediario.

Apoyando nuestra hipótesis están los conocimientos adquiridos por los distintos estudios físico químicos realizados; parece ser - que existen en la insulina una serie de grupos que son necesarios - para mantener la estructura tridimensional de la molécula, que a su vez es absolutamente necesaria para la completa expresión de su actividad biológica. Cualquier modificación de la molécula de insulina que produce una disminución de su actividad biológica va acompañada de cambios en la configuración de su molécula.

Sin embargo, sí parece bastante claro que la secretina es un - estimulante muy selecto y eficaz en la secreción de "mini insulina", Dos hechos de gran interes conviene recordar:

I.- La desaparición del componente "mini insulina" del plasma cuando los niveles absolutos de insulina retornan a sus valores basales - (fig. 15). Esto sugiere que su elevado porcentaje como respuesta a la secretina, se debe a que este componente es segregado por el páncreas como tal molécula, siendo su presencia en el plasma pasajera y posiblemente debido a la adaptación y puesta en marcha, de un sistema ó mecanismo enzimático hasta hoy desconocido. En esta misma línea de pensamiento se muestran Gross, Büber y Felber (199).

2.- El segundo hecho corresponde a la observación de gran número de investigadores, de que el efecto de la secretina sobre los islotes de Langrehans depende de la presencia del páncreas exocrino.

Los originales hallazgos de Guidoux-Grassi y Felber (140) y de Vanotti y col. (200), han sido recientemente confirmados por Hinz y col. (201) y por Goberna y col. (202), que observan como la secretina no es capaz de estimular la secreción de insulina a partir de islotos aislados de páncreas de rata, ni de "slices" de tejido pancreático procedente de glándulas con insuficiencia exocrina. Por otra parte, también Hinz demuestra que en las mismas condiciones experimentales, la pancreocimina sí estimula la secreción de insulina.

De todos estos hechos parece bastante probable que la secretina puede estimular la secreción de insulina de los islotes de Lángershans por intermedio del páncreas exocrino.

Hace tiempo se sabe que la secretina estimula principalmente la producción de agua y bicarbonatos por el páncreas exocrino. Queda por establecer si ciertos enzimas que intervienen en esta parte de la - función pancreática, pueden afectar el mecanismo secretorio de los islotes de Lángershans. Una publicación muy reciente de Felber y col. (203), demuestra como la tripsina "in vivo", es capaz de estimular la secreción de insulina de manera análoga a la secretina.

No obstante, a pesar de los estudios de Young y Carpenter (204) entre otros, que demuestran "in vitro", como la tripsina puede actuar sobre la molécula de insulina dando lugar a "desoctapeptido insulina" cuya actividad biológica valorada por el efecto hipoglucémico en el

conejo es solamente de un 10 a 20% del efecto producido por la verdadera hormona, mientras que conserva su capacidad inmunológica que Yalow y Berson (46) demostraron que puede variar según el origen del antisuero utilizado; trabajos mas recientes de Steiner y Oyer (94) y de Clark y Steiner (96) con "proinsulinas" radioactivas de origen humano y de rata, así como un trabajo de Melani y col. (176) con el "CPL" ó "componente proinsulínico", aislado del plasma humano, demuestran que la exposición "in vitro" de estas sustancias a grandes concentraciones de tripsina las convierte en un material con características similares a la insulina y al "desoctapeptido insulina". Como el producto de la digestión tripsica en los dos trabajos de Steiner, no tiene el aminoácido treonina (en la proinsulina humana) ni serina (en la de la rata) en la posición B₃₀, este enzima no puede cumplir todos los requisitos necesarios propuestos para el enzima que convierte intracelularmente la proinsulina en insulina.

Sin embargo, se ha sugerido la posible existencia "in vivo" de un enzima modificado y análogo a la tripsina, que actuaría en conjunción con una proteasa de actividad similar a la carboxipeptidasa B, y convertiría la proinsulina en insulina (97). Aunque este enzima no ha sido aislado aún, su actividad puede ser parcialmente inhibida por ciertas sustancias que son inhibidores de la tripsina (205).

Todos estos hechos apoyarían nuestra hipótesis, sugiriendo la

posibilidad que el nuevo componente descrito pueda corresponder a un producto derivado de la insulina por la acción de ciertos enzimas.

De un interes muy particular por lo demostrativo de los datos obtenidas, son, las diferencias existentes entre la respuesta fisiológica del páncreas a la estimulación con glucosa según su via de aplicación sea la via intragástrica ó la via intravenosa. La diferente ruta de administración afecta grandemente no solo al aspecto cuantitativo, sino que tambien influye en las propiedades cualitativas de la hormona secretada.

Como respuesta a la estimulación parenteral con glucosa, observamos una intensa y rápida elevación de los niveles glucémicos ($p < < 0.001$), que actuando directamente sobre los islotes de Langerhans induce un aumento de secreción de insulina, alcanzando la hormona concentraciones muy elevadas en sangre portal tres minutos despues de aplicado el estímulo ($p < 0.001$).

Cuando la glucosa la administramos por sonda intragástrica, tambien se aprecia una elevación en los niveles glucémicos, pero en este caso es más lenta y menos pronunciada mostrando valores estadisticamente significativos ($p < 0.02$) a los 45 minutos de aplicado el estímulo. Por trabajos previamente publicados sabemos, como la respuesta maxima a este tipo de estimulación se obtiene 45 minutos des-

pues de administrada la glucosa. A este tiempo, los valores absolutos de insulina que detectamos en sangre portal tambien aparecen elevados ($p < 0.005$); esta elevación que continua significativa ($p < 0.001$) a los 90 minutos de aplicado el estímulo, coincide con los valores glucémicos ya normalizados (p no significativa). Tablas X y XI.

Según las observaciones clásicas de Mo Intyre y col.(112), en el hombre son más elevados los niveles de insulina circulante que acompañan a la hiperglucemia inducida por glucosa oral, que la insuline-mia resultante de un grado similar de hiperglucemia producida por la glucosa parenteral.

Por su parte, Seltzer y col. (126) en perros, llegan a la conclusión de que la secreción de insulina es una función que depende directamente del grado de hiperglucemia alcanzado, no interviniendo para nada la ruta seguida en la administración de la glucosa. Esta observación puede explicar nuestros datos, y sugiere la posibilidad de como en la respuesta pancreática pueden existir importantes diferencias propias de cada especie, que probablemente dependen de los hábitos dietéticos del animal, así como de la morfología del páncreas e intestino.

Pero lo que verdaderamente atrae nuestro interés son, las diferencias observadas en las características cromatográficas de la hormona circulante.

Mientras que, en respuesta a la estimulación parenteral con glucosa, el porcentaje mayor de insulina en la sangre portal corresponde a "little insulina", es decir a insulina que consideramos inmunológica y biológicamente activa (figu.18), confirmando, que la glucosa intravenosa estimula la hormona almacenada en los gránulos de secreción de las células β del páncreas; la insulina secretada como respuesta a la administración oral de la glucosa, presenta unas características muy particulares. En estas condiciones experimentales, solamente un 50 % de la hormona circulante corresponde a "little insulina", encontrándose muy elevados los otros dos componentes restantes "big insulina" y "mini insulina" ($p < 0.001$), fig 19 , tablas X y XI.

La elevación en los valores porcentuales del componente "big insulina" fué observada por primera vez por Roth en el hombre, y en esta misma situación experimental. Posteriormente Gorden y col. (192) han realizado un estudio muy completo también en humanos, de la dinámica de secreción de "big insulina" como respuesta a la glucosa oral. Sus resultados demuestran como el mayor porcentaje de este componente en sangre periférica está en razón directa al tiempo transcurrido desde la aplicación del estímulo. Estos investigadores dividen la respuesta en tres fases: en la primera fase, que corresponde aproximadamente a los primeros 30 minutos, la concentración de "big insulina" en sangre es baja, comparándola con los cambios presentados en la concentra-

ción total de insulina circulante. La segunda fase comprende de los 45 á 90 minutos, y en ella la razón "big insulina"/insulina total se se eleva mucho independientemente de los cambios ocurridos en la concentración absoluta de la hormona. La tercera y última fase, comprende desde los 90 minutos y probablemente continua durante las próximas horas; en ella "big insulina"/insulina total permanece constante. Resultados similares han obtenido Melani y col.(176) y Goldsmith y col (178).

Nosotros solamente hemos estudiado los porcentajes de "big insulina" a los 45 minutos de aplicado el estímulo es decir, coincidiendo con la secreción máxima de la hormona y, tardamente a los 90 minutos de la estimulación. Nuestros resultados estan de acuerdo con la división propuesta por Gorden, (parte superior e inferior respectivamente de la fig. 19).

La importancia de "big insulina" en la sangre está determinada por su naturaleza y actividad biológica. Por las razones indicadas en la primera parte de esta discusión, consideramos que esta fracción ó componente corresponde a la "proinsulina" y "componentes afines".

Aunque hay evidencia de que la principal función de la "proinsulina" es facilitar y asegurar la formación correcta de los enlaces ó puentes disulfuro de la molécula de insulina durante el proceso de biosíntesis de la hormona en las células β del páncreas, es muy

posible que esta molécula también tenga unas funciones extrapancreáticas de una naturaleza regulatoria, diferentes quizá en algunos aspectos de la verdadera insulina.

Es probable que, la "proinsulina" después de ser sintetizada en los ribosomas del retículo endoplásmico de las células β (206), sea transportada al aparato de Golgi (97 - 207), donde se convierte en insulina y posteriormente se almacena en los gránulos de secreción (208). La conversión de "proinsulina" a insulina puede tener lugar no solo en el aparato de Golgi, sino también dentro de los gránulos durante su proceso de formación y maduración (209). Aunque hay pocos datos concernientes a la proporción relativa de "proinsulina" e insulina almacenadas en los gránulos de secreción, es posible que el proceso de la conversión no sea siempre completo, y que un pequeño porcentaje de la proteína permanezca en los gránulos como "proinsulina". De aquí que, la liberación de los gránulos después de la estimulación con la glucosa oral, podría dar lugar a la secreción de pequeñas cantidades de "proinsulina" junto con la insulina, y la proporción relativa de estas proteínas podría variar dependiendo del estado de maduración de los gránulos secretados. Por otra parte, también debemos tener en cuenta la posibilidad de la secreción de "proinsulina" e insulina independientemente de la formación de los gránulos, ó bien la secreción de gránulos inmaduros ó "pregránulos", que contienen mayor

proporción de "proinsulina" (208). Esto podría estar de acuerdo con la hipótesis de la secreción a partir del aparato de Golgi de hormona recientemente sintetizada, ó bien de la disolución selectiva de los gránulos (210 -211).

Desde otro ángulo, el interes en conocer la actividad biológica de la "proinsulina" ha sido y sigue siendo muy grande. Sin embargo, pocos autores han interpretado sus resultados interpolados a los niveles absolutos de "proinsulina" circulante, y al posible efecto biológico sobre los tejidos periféricos de las concentraciones relativamente bajas de esta molécula. La mayor parte de los estudios realizados sobre la actividad de este precursor biosintético de la insulina, se han hecho "in vitro" sobre tejidos aislados, una situación experimental que puede diferir considerablemente de las condiciones en que puede encontrarse en el organismo vivo.

En el animal intacto, Chance y col (101) utilizando el método de las convulsiones en el ratón, han demostrado como la "proinsulina" pura de origen porcino tiene una actividad biológica de 3 I U/mg, comparada a las 25 I U/mg que tiene la insulina. Por otra parte, cuando se valora el efecto hipoglucémico en las ratas ayunadas, la "proinsulina" pura de bovino dá valores de 10 I U/mg de proteína, teniendo un efecto menor en los animales alimentados (212); la hipofisectomia y adrenalectomia aumentan la respuesta hipoglucémica en estos animales

(213).

Los estudios realizados "in vitro" sobre el diafragma de rata demuestran que, tanto la "proinsulina" cristalizada de porcino como la "proinsulina" de origen bovino, estimulan la captación de glucosa y formación de glucógeno, aunque su actividad corresponde solamente a un 20 ó 30 % de la actividad de la hormona verdadera. Sobre tejido adiposo y células grasas aisladas, la "proinsulina" influye en los mismos parámetros metabólicos que la insulina (captación de glucosa, oxidación de glucosa e incorporación de glucosa a triglicéridos), disminuyendo la lipólisis inducida por la epinefrina, teofilina y glucagon. Sin embargo, los resultados obtenidos son variables, dependiendo de las condiciones experimentales y de los parámetros valorados.

Siguiendo con la exposición de nuestros resultados, en cuanto al componente "mini insulina", en los animales estimulados con glucosa oral también se encuentra muy elevado, tanto a los 45 como a los 90 minutos después de aplicado el estímulo. Sin embargo, el hecho de que la glucosa oral en contraste con la glucosa intravenosa sea capaz de elevar el componente "mini insulina" en sangre, hace pensar que su efecto no sea directo, sino, mediado por alguna de las hormonas intestinales y, concretamente por la secretina. Esta hipótesis está apoyada en los recientes estudios de Chisholm y col (172), quienes utilizando un radioinmunoensayo muy específico y sensible para la secre-

tina observan, como la ingesta de glucosa produce una rápida elevación de los niveles de secretina en la sangre, que precede a la elevación de las insulinemias, postulando que la secretina actuaría como una llave en la secreción de la hormona pancreática. Por otra parte, la secretina parece tener un doble papel en la secreción de insulina (214), una estimulación rápida y directa, y una potenciación prolongada del efecto glucémico; el efecto potenciador es de tal magnitud que, sugiere la posibilidad de ser la secretina el factor dominante en la secreción de insulina inducida por la glucosa oral. Sin embargo, nosotros no podemos excluir otros factores intestinales que lógicamente también pueden influir en la respuesta del páncreas a la administración de la glucosa oral.

No sabemos por qué el grupo de Roth no ha detectado este componente en sus estudios con glucosa oral. Tres posibilidades podemos barajar: 1) Los investigadores mencionados estudian los componentes insulínicos en sangre periférica, mientras que nuestro estudio está realizado en sangre portal y, refleja directamente la hormona secretada por el páncreas. No sabemos en este caso el papel que el hígado pueda tener en la extracción de "mini insulina"; esto forma parte del proyecto de estudio que realizaremos posteriormente. La 2ª posibilidad es, recordando una vez más, el papel tan importante que tienen en estas valoraciones los antisueros utilizados. La diferente capacidad

de reacción de estos antisueros anti-insulina con los componentes "big insulina" y "mini insulina", logicamente influye en su detección y en los porcentajes obtenidos. Por último, Roth y su grupo han realizado todos sus estudios en el hombre; por nuestra parte, el estudio se ha llevado a cabo en un animal que difiere grandemente del hombre no solo en sus hábitos alimenticios, sino posiblemente también en la morfología del intestino y del páncreas, lo que puede influir en los resultados obtenidos.

Sin embargo, nuestros resultados refuerzan la idea de la gran importancia que están adquiriendo las hormonas gastrointestinales como reguladoras de la secreción de insulina ó sustancias inmunológicamente afines, tanto en las situaciones fisiológicas, como en las patológicas. En este último sentido, los recientes hallazgos de Chisholm y col. (215) apoyan su interés. Así tenemos el importante hecho de que la secretina está muy elevada en el plasma de personas prediabéticas y en la diabetes temprana, indicando que la secretina probablemente tiene un efecto compensador, y el componente "mini insulina" pudiera ser un importante mediador en estas situaciones límite.

Por último, no podemos dejar de señalar como la existencia de los tres componentes insulínicos inmunorreactivos descritos en esta Tesis, nos hacen recordar las diferentes formas de actividad insulínica del plasma (ILA), estudiadas en los últimos años con el nombre

de "insulina combinada" (bound I) (71), "insulina atípica" (63), "actividad insulínica no supresible" (NSILA) (59), y cuya descripción llevamos a cabo extensamente en la Introducción de la Tesis. El hecho de que estas sustancias solamente sean activas en las valoraciones biológicas "in vitro", y sus efectos no se alteren por la presencia de los antisueros específicos anti-insulina, nos lleva a admitir, que dichas sustancias no están relacionadas con los componentes inmunorreactivos descritos.

Por otra parte, si admitimos la posibilidad que el componente que Elliot y col. (110) aislaron del suero de enfermos diabéticos juveniles no tratados con insulina, y al que denominaron "insulina anormal", pueda estar relacionado con el componente "big insulina".

De todo lo anteriormente expuesto es lógico deducir que, nuestros hallazgos abren un nuevo campo en el conocimiento de la fisiología de la insulina y probablemente de la diabetes. Respecto al componente "mini insulina", aunque numerosos estudios en cuanto a su naturaleza, biología, fisiología y patología, son necesarios, la importancia de nuevos hallazgos científicos viene determinada por las nuevas vías que se abren al conocimiento de la regulación de la síntesis y secreción de insulina; y en este sentido creemos que el componente "mini insulina" cumplirá ampliamente estos requisitos.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1.- En esta Tesis Doctoral, se ha realizado por primera vez un estudio conjunto de los aspectos cuantitativos y propiedades cualitativas de la insulina circulante en situaciones experimentales en las que hasta la fecha, no se habia tenido en cuenta la presencia en la sangre de otras proteínas diferentes de la verdadera insulina, pero capaces de reaccionar con los antisueros específicos anti-insulina, y por tanto valorables por las técnicas radioinmunológicas.

Hemos llevado a cabo el estudio en sangre de la vena porta del conejo, con el fin de analizar la hormona directamente secretada por las células β del páncreas.

2.- Para poder efectuar este estudio, fué necesario en primer lugar el desarrollo y montaje de una técnica radioinmunológica de gran sensibilidad y precisión, capaz de detectar las muy bajas concentraciones en que se encuentran los componentes insulínicos del plasma.

La técnica desarrollada es "una modificación del método original

de Yalow y Berson", consistente en: 1) Marcaje de la insulina con I^{125}
2) Purificación de la hormona marcada por cromatografía en geles de
sephadex G-50. 3) Separación del complejo formado por la insulina-
 I^{125} - anticuerpo de la insulina- I^{125} libre, por cromatografía en
papel Whatman 311 a temperatura ambiente.

3.- Hemos encontrado que en la sangre portal del conejo, la insulina endógena valorada por el radioinmunoensayo como componente único, se puede separar en tres fracciones ó componentes que presentan características cromatográficas propias, y capacidad inmunológica frente a los antisueros específicos anti-insulina.

Dos de estos componentes son similares a los descritos por Roth en humanos con los nombres de "big insulina" y "little insulina", respectivamente. El tercer componente que aparece consistentemente, se describe por primera vez en esta Tesis Doctoral. Este nuevo componente, por las características cromatográficas que presenta ha sido denominado tentativamente "mini insulina".

4.- En nuestro sistema experimental, el componente "big insulina" muestra características cromatográficas e inmunológicas análogas a las que presenta la "proinsulina" cristalizada de origen pancreático, por lo que podemos concluir de acuerdo con Roth, Lazarus y Melani

entre otros, que este componente representa al precursor biosintético de la insulina, y probablemente a las llamadas "formas intermedias".

5.- El componente "little insulina", por sus características cromatográficas e inmunológicas semejantes a las de la insulina cristalizada de origen pancreático, corresponde a la hormona verdadera y/o a insulina que ha sufrido ligeras modificaciones (deamidación), pero que conserva intactas sus capacidades biológica e inmunológica.

6.- El componente "mini insulina", por sus características cromatográficas corresponde a un material de un peso molecular aproximadamente de 3000 a 3500, aunque no podemos excluir otras propiedades tales como mayor ó menor asimetría de la molécula y que pueden influir en su patron cromatográfico.

Por su capacidad para reaccionar con los antisueros específicos anti-insulina, este material nos hace sospechar que contiene una gran parte de la estructura intacta de la molécula de la insulina.

7.- Con el antisuero específico anti-insulina de porcino (Lote K 9223) utilizado en nuestro sistema de trabajo, la "proinsulina" cristalizada de origen porcino, presenta un grado de reacción inmunológica de un 45 % aproximadamente de la capacidad presentada por la insuli-

na de origen bovino. El "péptido C" de origen porcino aparece inerte, no mostrando capacidad de reacción con el antisuero anti-insulina.

- 8.- De nuestros resultados podemos sugerir que, el componente "mini insulina" no corresponde al "péptido C" circulante en la sangre del conejo. Al mismo tiempo conviene indicar que, dicho "péptido C" no se detecta en nuestro sistema experimental.
- 9.- "Mini insulina" es un componente normal en algunas preparaciones comerciales de insulina cristalizada, donde representa de un 2 a 4 % del material inmunorreactivo. También el componente "big insulina" está presente correspondiendo de un 4 a 6 % de la proteína total.
- 10.- Los tres componentes inmunorreactivos descritos, "big insulina", "little insulina" y "mini insulina", circulan en la sangre portal de conejos normales, y son segregados por el páncreas en respuesta a la administración de estímulos insulinogénicos.
- 11.- En condiciones basales (ayuno de 24 horas), el porcentaje del componente "big insulina" está ligeramente elevado, indicando que, en esta situación experimental una pequeña cantidad del material inmunorreactivo corresponde al precursor biosintético de la insulina.

El ayuno prolongado por sí solo, no altera los valores porcentuales del componente "big insulina", que se muestran análogos a los encontrados en las condiciones basales.

El porcentaje de "big insulina" también permanece sin alteraciones después de la estimulación con glucagón, glucosa intravenosa, secretina y pancreocimina; elevándose moderadamente a los diez minutos de la estimulación con tolbutamida.

Los valores porcentuales del componente "big insulina" se presentan considerablemente elevados a los 45 y 90 minutos de la administración intragástrica de glucosa.

12.- Ya que el mayor determinante de la presencia en la sangre del componente "big insulina" parece ser, el tiempo transcurrido desde la estimulación de la secreción de insulina, podemos admitir de acuerdo con Gorden y col. que, por analogía al papel que representa la "proinsulina" en la biosíntesis de la insulina, cuando se estimula la secreción de la hormona, la mayor parte de la insulina segregada inmediatamente corresponde a la hormona que ha sido sintetizada anteriormente y que existe depositada en los gránulos de secreción de las células β . Al mismo tiempo también se estimula la síntesis de insulina de tal manera que, con el tiempo, la hormona segregada representa material recién sintetizado.

13.- El componente "little insulina", representa el mayor porcentaje de la hormona que circula en las condiciones basales y en el ayuno prolongado; observándose en este último caso, una disminución general de las concentraciones absolutas de insulina inmunorreactiva.

Los valores porcentuales de "little insulina" permanecen sin alteraciones después de la estimulación con glucagón y glucosa intravenosa, encontrándose ligeramente disminuidos a los diez minutos de la estimulación con tolbutamida. La administración de pancreocimina produce una disminución del componente "little insulina" en los animales que están en ayuno de 24 horas, pero este componente aparece con porcentajes normales en los conejos sometidos a un ayuno de 48 horas.

Los valores porcentuales de "little insulina" aparecen considerablemente disminuidos después de la administración de secretina y glucosa oral; en estos casos, solamente un 50 % de la hormona circulante corresponde a "little insulina".

14.- En nuestras condiciones experimentales podemos concluir admitiendo que, tanto en condiciones basales y de ayuno prolongado, como después de la estimulación con glucagón, tolbutamida, glucosa intravenosa y pancreocimina, la presencia en la sangre de los componentes "big insulina" y "mini insulina" no alteran significativamente los

valores de insulina total aportados por las técnicas radioinmunológicas de rutina, siendo bastante aproximados los valores de "little insulina" y las concentraciones absolutas de la hormona circulante. En las condiciones expuestas, la mayor parte de insulina circulante corresponde pues, a "little insulina", es decir, a insulina que consideramos inmunológica y biologicamente activa.

- 15.- "Mini insulina", es el tercer componente que circula normalmente en mínimas cantidades en la sangre de la vena porta de animales en condiciones basales. Tanto el ayuno prolongado como la estimulación con glucagón, tolbutamida y glucosa intravenosa, no alteran los valores porcentuales del componente "mini insulina".

En el ayuno de 24 horas, la administración de pancreocimina elevó significativamente el porcentaje de "mini insulina", que por otra parte, aparece normal cuando los animales están sometidos a un ayuno prolongado.

Los valores porcentuales de "mini insulina" aparecen considerablemente elevados despues de la estimulación con secretina y glucosa oral.

- 16.- Parece bastante probable que, la secretina sea el estímulo mas importante y eficaz en la secreción del componente "mini insulina".

El hecho que la glucosa oral, en contraste con la glucosa intra-

venosa eleve el porcentaje del componente "mini insulina" apoya la observación de Chisholm y col., indicando que la secretina puede ser un mediador en la respuesta pancreática a la administración oral de la glucosa.

17.- La importancia fisiológica del nuevo componente descrito en esta Tesis depende en parte de su naturaleza y propiedades biológicas. El estudio de ambos puntos comprende nuevas líneas de investigación que quedan abiertas para el futuro.

Sin embargo, la falta de efecto hipoglucémico que acompaña a los elevados porcentajes del componente "mini insulina" que circula en sangre como respuesta a la estimulación con secretina, nos hace pensar en las siguientes posibilidades: 1) Que el componente "mini insulina" corresponda a hormona biologicamente inactiva. 2) Que el componente "mini insulina" no favorezca la captación de glucosa por los tejidos periféricos, aunque puede actuar a otros niveles del metabolismo intermediario. 3) El componente "mini insulina" puede actuar alterando ó bloqueando alguna de las acciones de la insulina sobre las células.

CONCLUSION GENERAL.

Los resultados descritos en esta Tesis Doctoral, ponen abiertamente en duda la especificidad de las técnicas radioinmunológicas en la determinación de la insulina en sangre. Ciertamente, no es la insulina la única proteína circulante capaz de reaccionar con los antisueros específicos anti-insulina, existen por lo menos otros dos componentes que a su vez comprenden diferentes proteínas, que pueden ser valorados en el radioinmunoensayo de rutina. Esto hace bastante probable, que los altos niveles de insulina inmunorreactiva (IRI) que se han observado en los estadios iniciales de la diabetes méllitus y de otras enfermedades que entran dentro de la denominación general de "estados resistentes a la insulina", se deban a la presencia en la sangre de estas diferentes proteínas inmunorreactivas. Por esta razón, una vez más, creemos necesario señalar y recordar la importancia de llevar a cabo una revisión completa de la fisiopatología de la secreción de la hormona pancreática, para poder interpretar a la luz de los conocimientos actuales, la significación de los valores de insulina inmunorreactiva (IRI) publicados previamente. En este sentido presentan un interes muy particular el estudio de la diabetes mellitus, el ayuno prolongado, la obesidad, el embarazo etc...; es decir, aquellas situaciones que

se caracterizan por presentar una intolerancia a la glucosa acompañada de concentraciones de insulina en sangre normales ó de hiperinsulinismo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Banting F.G. and Best C.H. - J. Lab. Clin. Med. 7, 251, 764
(1921 - 1922)
- (2) Abel J.J. - Science 66, 307 (1927)
- (3) Sanger F. - Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology vol.
19, p. 110 (1956)
- (4) Nicol D.S. and Smith L.F. - Nature 187, 483 (1960)
- (5) Smith L.F. cited by Young F.G. - Brit. Med. J. II, 1449 (1961)
- (6) Gellhorn E., Feldman J. and Allen A. - Endocrinology 29, 137
(1941)
- (7) Rafaelsen O.J. - Rep. IV Kong. Inter. Diab. Federation. Geneve
p. 625 (1961)
- (8) Gemmill C.L. - Bull. Johns Hopkins Hosp. 66, 232 (1940)
- (9) Groen J., Kaminga C.E., Willebrands A.F. and Blickman J.R. -
J. Clin. Invest. 31, 97 (1952)
- (10) Vallance-Owen J. - Rep. III Kong. Intern. Diab. Feder. Düssel-
dorf 1958 p. 587
- (11) Randle P.J. - Brit. Med. J. 1, 1237 (1954)
- (12) Perlmutter M., Weisenfeld S. and Mufson M. - Endocrinology 50,
442 (1952)
- (13) Kralh W.E. and Wool I.G. - Abstr. IVth. Intern. Cong. Biochem.

Vienna. abstr 9, 4, 102 (1958)

- (14) Wright P.H. - Biochem. J. 71, 633 (1959)
- (15) Manchester K.L., Randle P.J. and Young F.G. - J. Endocrino.
19, 259 (1959)
- (16) Metz R. - Diabetes 9, 89 (1960)
- (17) Vallance-Owen J. and Lukens F.D. - Endocrinology 60, 625 (1957)
- (18) Castrillon A.M., Garcia-Fernandez M.C., Candela R.R. and Candela J.L.R. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 172 (1962)
- (19) Hausberger F.X., Milstein S.W. and Rutman E.J. - J. Biol. Chem.
208, 431 (1954)
- (20) Steelman S.L., Oslapas R. and Busch R.D. - Proc. Soc. Exp.
Biol. Med. 105, 595 (1960)
- (21) Beigelman P.M. - Metabolism 9, 580 (1960)
- (22) Ramseier E.B., Froesch E.R., Bally P. and Labhardt A. - Rep.
IV Kongr. Intern. Diab. Geneve p.643 (1961)
- (23) Ball E.G. and Merrill M.A. - Endocrinology 69, 596 (1961)
- (24) Cahill G.F., Leboeuf B. and Renold A.E. - J. Biol. Chem. 234,
2540 (1959)
- (25) Martin D.B., Renold A.E. and Dagenais Y.M. - Lancet 2, 76
(1958)
- (26) Leonards J.B., Landau B.R. and Bartsch G. - J. Lab. Clin. Med.
60, 552 (1962)

- (27) Egdahl R.H. and Goldberg H. - Surgery Gynec. Obst. 114, 202 (1962)
- (28) Samaan N.A., Dempster W.J., Fraser R., Please N.W. and Stillman D. - J. Endocrin. 24, 263 (1962)
- (29) Renold A.E., Martin D.B., Dagenais Y.M., Steinke J., Nickerson R.J. and Sheps M. - J. Clin. Invest. 39, 1487 (1960)
- (30) Mirsky I.A. and Perisutti G. - Biochem. Biophys. Acta 50, 603 (1961)
- (31) Renold A.E., Zahnd G., Jeanrenaud B. and Boshell B.R. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 74, 490 (1959)
- (32) Haurowitz F. - "Chemistry and Biology of Protein" p. 284. Academic Press. New York 1950
- (33) Lowell F.C. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 50, 167 (1942)
- (34) Lerman S. - Am. J. Med. Sci. 207, 354 (1944)
- (35) Moloney P.J. and Coval M. - Biochem. J. 59, 179 (1955)
- (36) Berson S.A., Yalow R.S., Bauman A., Rothschild M.A. and Newerly K. - Northwest Med. 55, 541 (1956)
- (37) Berson S.A., Yalow R.S., Bauman A., Rothschild M.A. and Newerly K. - J. Clin. Invest. 35, 170 (1956)
- (38) Arquilla E.R. and Stavitsky A.B. - J. Clin. Invest. 35, 458 (1956)
- (39) Berson S.A., cited in Levine R. and Anderson E. - "Resume of

- Conference on Insulin Activity in Blood and Tissue Fluids",
May 9, p. 7 1957. Natl. Inst. Health Bethesda, Maryland 1957
- (40) Berson S.A. and Yalow R.S. - Advances in Biol. Med. Phys. 6,
349 (1958)
 - (41) Berson S.A. and Yalow R.S. - Ann. N. Y. Acad. Sci. 82, 338
(1959)
 - (42) Berson S.A. and Yalow R.S. - "Hormones in Plasma" H.N. Anto-
niades ed.) p. 86, Little, Brown, Massachusetts 1960
 - (43) Berson S.A. and Yalow R.S. - In Ciba Foundation Colloquia on
Endocrinology vol. 14, Immunoassay of Hormones, Churchill,
London p. 182 (1962)
 - (44) Morgan C.R. and Lazarow A.- Diabetes 12, 115 (1963)
 - (45) Yalow R.S. and Berson S.A. - J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960)
 - (46) Yalow R.S. and Berson S.A. - Amer. J. Med. 31, 882 (1961)
 - (47) Grodsky G. M., Peng C.T. and Forsham P.H. - Arch. Biochem. Bio-
phys. 81, 264 (1959)
 - (48) Randle P.J. - Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology vol.
11 p. 115 Churchill. London.
 - (49) Willebrands A.F., V. d. Geld H. and Groen J. - Diabetes 7,
119 (1958)
 - (50) Hales C.N. and Randle P.J.- Lancet 1, 200 (1963)
 - (51) Groen J., V. d. Geld H., Bolingen R. and Willebrands A.F. -

Diabetes 7, 272 (1958)

- (52) Gundersen K. and Antoniadou H.N. - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104, 411 (1960)
- (53) Vallance-Owen J. - *Rep. III Kongr. Intern. Diab. Feder. Düsseldorf 1958* p. 605
- (54) Lowy C., Blanchard C. and Phear D. - *Lancet* 1, 802 (1961)
- (55) Vallance-Owen J., Dennes E. and Campbell P.N. - *Lancet* 2, 596 (1958)
- (56) Vallance-Owen J. and Lilley M.D. - *Lancet* 1, 804 (1961)
- (57) Ensink J. and Vallance-Owen J. - *Diabetes* 12, 353 (1963)
- (58) Ramseier E.B., Froesch E.R., Bally P. and Labhart A. - *Med. Hyg.* 20, 643 (1962)
- (59) Froesch E.R., Bürgi N., Ramseier E.B., Bally P. and Labhart A. - *J. Clin. Invest.* 42, 1816 (1963)
- (60) Slater J.D., Samaan N.A., Fraser R. and Stillman D. - *Brit. Med. J.* 1, 1712 (1961)
- (61) Froesch E.R., Bürgi H. and Müller W.A. - *Proc. Symp. on the Transport. Function of plasma Proteins. Paris 1965 Elsevier (Amsterdam)* p. 75 (1966)
- (62) Bürgi H., Müller W.A., Hummel R.E., Labhart A. and Froesch E.R. - *Biochem. Biophys Acta* 121, 349 (1966)
- (63) Samaan N.A., Fraser R. and Dampster J.W. - *Diabetes* 12, 339

(1963)

- (64) Lyngsoe J., Adams L.C., Greep J.M. and Field R.A. - *Acta Endoc.* 54, 141 (1967)
- (65) Kopetz K., Bürgi H., Froesch E.R. and Schwarz P. - *Diabetologia* 2, 104 (1966)
- (66) Samols E. - Immunochemical aspects of Insulin. In "On the Nature and Treatment of Diabetes". p. 227. Editors Leibal B.S. and Wrenshall G.A. ICS 84. Excerpta Medica, Amsterdam (1965)
- (67) Antoniades H.N., Bougas J.A. and Pyle H.M. - *New. Engl. J. Med.* 267, 218 (1962)
- (68) Antoniades H.N., Gundersen K. and Pyle H.M. - *Endocrinology* 69, 163 (1961)
- (69) Gundersen K. - *Diabetes* 11, 69 (1962)
- (70) Antoniades H.N. - *Endocrinology* 68, 7 (1961)
- (71) Antoniades H.N., Bougas J.A., Camerini-Davals R. and Pyle H.M. - *Diabetes* 13, 230 (1964)
- (72) Antoniades H.N., Huber A.M., Boshell R.B., Saravis C.A. and Gershoff S.N. - *Endocrinology* 76, 709 (1965)
- (73) Gundersen K. and Lin B.J. - *Diabetes* 14, 805 (1965)
- (74) Alp H. and Recant L. - *J. Clin. Invest.* 44, 870 (1965)
- (75) Davidson J.K. and Haist R.E. - *Lancet* 2, 656 (1963)

- (76) Alp H. and Recant L. - Metabolism 13, 609 (1964)
- (77) Lingsoe J. - Acta Med. Scand. 174, 589 (1963)
- (78) Lingsoe J. - Acta Med. Scand. 175, 401 (1964)
- (79) Taylor K.W. and Randle P.J. - J. Endocri. 19, 221 (1959)
- (80) Ditschneit H., Cuendet R. and Pfeiffer E.F. - Path. Biol. 12, 148 (1964)
- (81) Beigelman P.M. and Onoprienko I.S. - Diabetes 8, 438 (1959)
- (82) Glieman J. - Diabetes 14, 643 (1965)
- (83) Lyngsoe J. and Lundbaek K. - Acta Med. Scand. 180, 677 (1966)
- (84) Lyngsoe J. - Acta Med. Scand. Suppl. 476, 43 (1967)
- (85) Bürgi H., Ramseier E.B., Froesch E.R., Bally P. and Labhart A. - Helv. Med. Acta 29, 527 (1962)
- (86) Berson S.A. and Yalow R.S. - Amer. J. Med. 40, 676 (1966)
- (87) Steinke J. and Soeldner J.S. - In Leibel Wrenshall: The Nature and Treatment of Diabetes, Excerpta Medica. Amsterdam p. 213 (1965)
- (88) Samols E. - Lancet 1, 462 (1965)
- (89) Samols E. and Marks V. - Lancet 2, 700 (1966)
- (90) Armin J., Graut R.T. and Wright P.H. - J. Physiol. (London) 153, 146 (1960)
- (91) Armin J., Graut R.T. and Wright P.H. - J. Physiol. (London)

153, 146 (1960)

- (92) Humbel R.E. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 853 (1965)
- (93) Lazarow A. - Recent. Progr. Hormon. Res. 19, 489 (1963)
- (94) Steiner D.F. and Oyer P. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 473 (1967)
- (95) Steiner D.F., Cunningham D., Spigelman L. and Aten B. - Science 157, 697 (1967)
- (96) Clark J. and Steiner D.F. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 278 (1969)
- (97) Steiner D.F., Clark J.L., Nolan D., Rubenstein A.H., Aten B., Oyer P.E. - Recent. Progr. Horm. Res. 25, 207 (1969)
- (98) Tung A.K. and Yip C.C. - Diabetologia 4, 68 (1968)
- (99) Steiner D.F. - Trans. N. Y. Acad. Sci. 30, 60 (1967)
- (100) Steiner D.F. and Clark J. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 622 (1968)
- (101) Chance R.E., Ellis R.M. and Bromer W.W. - Science 161, 165 (1968)
- (102) Rubenstein A.H., Cho S., and Steiner D.F. - Lancet 2, 1353 (1968)
- (103) Steiner D.F., Hallund O., Rubenstein A.H., Cho S and Bayliss C. - Diabetes 17, 725 (1968)
- (104) Melani F., Rubenstein A.H., Oyer P.E. and Steiner D.F. - Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 67, 148 (1970)

- (105) Glieman J. and Moody A.J. - Cited by Rubenstein A. H. and col.
- Lancet 2, 1353 (1968)
- (106) Weiss L. and Narahana H.T. - Cited by Rubenstein A.H. and col.
- Lancet 2, 1353 (1968)
- (107) Comunicación personal de Novo Company, Copenhagen, Denmark
- (108) Roth J., Gorden P. and Pastan I. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA
61, 138 (1968)
- (109) Lazarus N.R., Tanese T., Gutman R. and Recant L. - J. Clin.
Endocr. 30, 273 (1970)
- (110) Elliot R.B., O'Brien D and Roy C.C. - Diabetes 14, 780 (1965)
- (111) O'Brien D., Shapcott D. and Roy C.C. - Diabetes 16, 572 (1967)
- (112) Mc Intyre N., Holdsworth C.D. and Turner D.S. - Lancet 2, 20
(1964)
- (113) Mc Intyre N., Holdsworth C.D. and Turner D.S. - J. Clin. Endoc.
25, 1317 (1965)
- (114) Dupré J. - Lancet 2, 672 (1964)
- (115) Candela J.L.R., Candela R.R., Martin-Hernandez D., and Casilla
Cortazar. - In Proc. IV Congress. of the Intern. Diabet. Feder.
Geneve. vol 1 p. 629 . Editions Medecine et Hygiene Geneve 1961
- (116) Samols E., Marri G. and Marks V. - Lancet 2, 415 (1965)
- (117) Mc Intyre N. - Proc. 6th Intern. Congress. Diabetes Federation

Stockholm 1967. Intern. Congress. n 172 p 425. Excerpta Med.

Found. Amsterdam (1969)

- (118) Bield A. and Kraus R. - Wien Klin. Wochschr 9, 55 (1896)
- (119) Woodyatt R.V., Sansum W.D. and Wilder R.M. - J. Amer. Med. Assoc. 65, 2067 (1916)
- (120) Lennox W.G. - J. Biol. Chem. 73, 237 (1927)
- (121) Koehler A.E. and Hill E. - J. Biol. Chem. 123, LXX (1938)
- (122) Scow R.O. and Cornfield J. - Amer. J. Physiol. 179, 435 (1954)
- (123) Mc Intyre N., Turner D.S. and Holdsworth C.D. - Diabetologia 1, 73 (1965)
- (124) Elrick H., Stimmler L., Hlad C.J. and Arai J. - J. Clin. Endoc. 14, 1076 (1964)
- (125) Marks V. and Samols E. - "Journées annuelles de Diabetologie de l'Hotel Dieux", p 179. Editions Medicales Flammarion. Paris (1969)
- (126) Seltzer H.J. and Mc Neff J. - Clin. Res. 15, 138 (1967)
- (127) Samols E., Tyler J., Marks V. and Miahle P. - Proc. 3rd Inter. Congr. Endocrinol. Mexico City. Intern. Congress. Ser. n 184 p 206 Excerpta Med. Found. Amsterdam 1969
- (128) Dupré J., Curtis J.D., Waddell R.W. and Beck J.C. - Lancet 2, 28 (1968)
- (129) Ajdukiewicz B., Keane P.M., Pearson J., Read A.E. and Salmon P.

- R. - Lancet 1, 92 (1968)
- (130) Jorpes J.E. and Mutt V. - "The Hormones" (G. Pincus, K.V. Thimann and Astwood E.B., Edi.) vol 4 p 365. Academic Press, New York (1964)
- (131) Harper A.A. - "Handbook of Physiology" (An Physiology Soc. J. Field. Sect. 6 vol 2 p 969. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland 1967)
- (132) Loew E.R., Gray J.S. and Ivy A.C. - Ame. J. Physiol. 129, 659 (1940)
- (133) Mutt V. and Jorpes J.E. - Recent. Advan. Horm. Res. 23, 483 (1967)
- (134) Jorpes J.E. and Mutt V. - Acta Physiol. Scand. 66, 316 (1966)
- (135) Bodanszky M., Ondetti M.A., Levine S.D., Narayanan V.L., v. Saltza M., Sheehan J.T., Williams N.J. and Sabo E.F. - Chem. & Ind (London) p 1757 (1966)
- (136) Pfeiffer E.F., Telib M., Ammon J., Melani F. and Ditschuneit H. - Diabetologia 1, 131 (1965)
- (137) Turner D.S. - Diabetologia 5, 57 (1969)
- (138) Buchanan K.D., Vance J.E., Morgan A. and Williams R.H. - Diabetologia 4, 376 (abstr. 1968)
- (139) Lazarus S.S., Shapiro S. and Volk B.W. - Diabetes 17, 152 (1968)
- (140) Guidoux-Grassi L. and Felber J.P. - Diabetologia 4, 391 (1968)

- (141) Dupré J., Rojas L., White J.J., Unger R.H. and Beck J.C. -
Lancet 2, 26 (1966)
- (142) Unger R.H., Ketterer H., Dupré J. and Eisentraut A.M. - J. Clin
Invest. 46, 630 (1967)
- (143) Deckert T. - Acta Endocrinology 57, 578 (1968)
- (144) Bottermann P., Schwarz K., Forell M.M., Stanhlheber H. and
Souvatzoglou A. - Klin. Wochschr 45, 52 (1967)
- (145) Nelson J.K., Rabinowitz D. and Merimee T.J. - Nature 215, 883
(1967)
- (146) Jarret R.J. and Cohen E.M. - Lancet 2, 861 (1967)
- (147) Dupré J., Curtis J.D., Waddell R.W. and Beck J.C. - Proc. 3rd
Intern. Cong. Endocr. Mexico City 1968.- Congress. Ser. n 184
p 202. Excerpta Med. Found. Amsterdam (1969)
- (148) Young J.D., Lazarus L. and Chisholm D.J. - Lancet 2, 914 (1968)
- (149) Wang C.C. and Grossman M.I. - Ann. J. Physiol. 164, 527 (1951)
- (150) Ramirez E., Hubel K.A. and Klifton J.A. - Ann. J. Physiol.
211, 260 (1966)
- (151) Jorpes J.E. - Gastroenterology 55, 157 (1968)
- (152) Lazarus N.R., Voyles N.R., Tanese T., Devrim S. and Recant L. -
Lancet 2, 248 (1968)
- (153) Malaisse W.J. and Malaisse-Lagae F. - Proc. 2nd Capri Conf.
1968 p 47 Casa editrice "Il Ponte" Milan (1968)

- (154) Pfeiffer E.F. and Telib M. - Proc. 2nd Capri Conf. 1968 p 30
Casa editrice "Il Ponte" Milan (1968)
- (155) Dupré J. and Beck J.C. - Diabetes 15, 555 (1966)
- (156) Bojms D.R., Jarrett R.J. and Keen H. - Brit. Med. J. 2, 676
(1967)
- (157) Meade R.C., Kneubuhler H.A., Schulte W.J. and Barboriak J. -
Diabetes 16, 141 (1967)
- (158) Ohneda A., Parada E., Eisentraut A.M. and Unger R.H. - J. Clin.
Invest. 47, 2305 (1968)
- (159) Rabinowitz D., Merimee T.J., Maffezzoli R. and Burgess J.A. -
Lancet 2, 454 (1966)
- (160) Floyd J.C., Fajans S.S., Conn J.W., Knopf R.F. and Rull S. -
J. Clin. Invest. 45, 1479 (1966)
- (161) Sukkar M.Y., Hunter W.M. and Passmore R. - Lancet 2, 1020 (1967)
- (162) Baylis E.M., Greenwood F., James V., Kenkins J., London J.,
Marks V. and Samols E. - Proc. Symp. Growth Hormone, Milan
1967. Intern. Congr. Ser. n 158 p 89. Excerpta Med. Found.
Amsterdam (1968)
- (163) Lucea C., Garrido H. y Parrilla R. - Rev. Iber. Endocr. 93,
223 (1969)
- (164) Jorpes J.E. and Mutt V. - Cited by Unger R.H. J. Clin. Invest.
46, 630 (1967)

- (165) Somogyi M. - J. Biol. Chem. 160, 61 (1945)
- (166) Nelson N. - J. Biol. Chem. 153, 375 (1944)
- (167) Lázaro-Martínez E., Gómez Acoba J. and Parrilla R. - Rev. Española Fisiol. 26, 21 (1970)
- (168) Greenwood F.C., Hunter W. and Glover J.S. - Biochem J. 89, 114 (1963)
- (169) Berson S.A. and Yalow R.S. - Ann. N. Y. Acad. Sci. 70, 56 (1957)
- (170) Zalme E. and Knowles H.C. Jr. - Diabetes 14, 165 (1965)
- (171) Samols E., Marri G. and Marks V. - Diabetes 15, 855 (1966)
- (172) Chisholm D.J., Young J.D. and Lazarus L. - J. Clin. Invest. 48, 1453 (1969)
- (173) Lerner R.L. and Porter D. Jr. - J. Clin. Invest. 49, 2276 (1970)
- (174) Blackard W.G., Nelson N.C. - Diabetes 19, 302 (1970)
- (175) Gorden P. and Roth J. - Arch. Intern. Med. vol 123, 237 (1969)
- (176) Melani F., Rubenstein A.H. and Steiner D.F. - J. Clin. Invest. 49, 497 (1970)
- (177) Sherman B.M., Gorden P., Roth J. and Freychet P. - J. Clin. Invest. 50, 849 (1971)
- (178) Goldsmith S.J., Yalow R.S. and Berson S.A. - Diabetes 18, 834 (1969)
- (179) Rubenstein A.H., Clark J.L., Melani F. and Steiner D.F. - Nature 224, 697 (1968)

- Engl. J. Med. 283, 713 (1970)
- (194) Rudman D. and Del Rio A.E. - Endocrinology 85, 2144 (1969)
- (195) Meade R.C., Kneubuhler H.A., Barboriak J.J. and Schulte W.S. - Diabetes 18, 397 (1969)
- (196) Horino M., Machlin L.J., Hertelendy F. and Kipnis M.D. - Endocrinology 83, 118 (1968)
- (197) Kuzuya T., Kanazawa Y and Kosaka K. - Metabolism 15, 1149 (1966)
- (198) Zierler K.L. and Rabinowitz D. - J. Clin. Invest. 43, 950 (1964)
- (199) Gross G., Büber V., Felber J.P. and Magnenat P. - Diabetologia 6, 47 (1970)
- (200) Vanotti A., Hadjikhani H., Fasel J., Guidoux L. and Felber J. P. - Amer. J. Proctol. 20, 68 (1969)
- (201) Hinz M., Katsilambros N., Schweitzer B., Raptis S. and Pfeiffer E.F. -Diabetologia 7, 1 (1971)
- (202) Goberna R., Fussgänger R.D., Raptis S., Telib M. and Pfeiffer E.F. - Diabetologia 7, 68 (1971)
- (203) Büber V. and Felber J.P. - Horm. Met. Res. 3, 61 (1971)
- (204) Young J.D. and Carpenter F.H. - Fed. Proc. 18, 201 (1959)
- (205) Kemmler W., Clark J. and Steiner D.F. - Diabetes 19 (suppl 1) 358 (1970)
- (206) Sorensen R.L., Steffes M.W., Lindall A.W. - Endocrinology 86, 88 (1970)

- (207) Howell S.L., Kostianovsky M. and Lacy P.E. - J. Cell. Biol. 42, 695 (1969)
- (208) Logothetopoulos J. - Diabetes 15, 823 (1966)
- (209) Steiner D.F. - N. Engl. J. Med. 280, 1106 (1969)
- (210) Haist R.R. - in "On the Nature and Treatment of Diabetes". Leibel B.S. and Wrenshall G.A. editors. Excerpta Medica Found. Amsterdam 12 (1965)
- (211) Creutzfeldt W.C., Creutzfeldt C., Frerchs H., Perings E. and Sikinger K. - Horm. Metab. Res. 1, 53 (1969)
- (212) Puls W. and Kroneberg G. - Diabetologia 5, 325 (1969)
- (213) Lazarus M.R., Penhos J.C., Tanese T., Michaels L., Gutman R. and Recant L. - J. Clin. Invest. 49, 487 (1970)
- (214) Kraegen E.W., Chisholm D.J., Young J.D. and Lazarus L. - J. Clin. Invest. 49, 524 (1970)
- (215) Chisholm D.J., Lazarus L., Young J.D. and Kraegen E. - Diabetes 19, 365 (suppl 1) (1970)